Aus dem Institut für Lebensmittelhygiene,
Fleischhygiene und -technologie
— Fachrichtung Fleischhygiene —
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Vergleichende Untersuchungen zur selektiven quantitativen Erfassung aerober Sporenbildner aus Lebensmitteln unter besonderer Berücksichtigung potentiell toxinogener Species

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Angelika Bläschke
Tierärztin aus Berlin

Berlin 1986
Journal-Nr. 1279

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549614_0033

Aus dem Institut für Lebensmittelhygiene,
Fleischhygiene und -technologie
- Fachrichtung Fleischhygiene -
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Vergleichende Untersuchungen zur selektiven quantitativen Erfassung aerober Sporenbildner aus Lebensmitteln unter besonderer Berücksichtigung potentiell toxinogener Species

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Angelika Bläschke
Tierärztin aus Berlin

Berlin 1986
Journal-Nr. 1279

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Fachbereichssprecher:	Prof. Dr. F. Hörchner
Erster Gutachter:	Prof. Dr. G. Reuter
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. E. Hellmann

Tag der Promotion: 25. April 1986

MEINER FAMILIE

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
2.	Literaturübersicht	3
2.1	Vorkommen von Bazillen in Lebensmitteln	3
2.1.1	Bazillen in Fleisch und Fleischerzeugnissen	4
2.1.2	Bazillen in Milch und Milcherzeugnissen	6
2.1.3	Bazillen in Reis	8
2.1.4	Bazillen in Gewürzen	8
2.1.5	Bazillen in Obst- und Gemüsekonserven	9
2.1.6	Bazillen in Gebäck, Snacks und Fertiggerichten	9
2.1.7	Bazillen in Säuglings- und Kleinkindernahrung	10
2.1.8	Bazillen in Nährmitteln und Trockennahrungsmitteln	11
2.1.9	Bazillen in sonstigen Lebensmitteln	12
2.2	Lebensmittelhygienisch relevante Bacillus-Species	13
2.2.1	Eigenschaften lebensmittelhygienisch relevanter Bacillus-Species	13
2.3	Vertreter des Genus Bacillus als Ursachen von Lebensmittelvergiftungen	16
2.3.1	Kasuistik	17
2.3.2	Klinische Charakteristika für einzelne Bacillus-Species	22
2.3.3	Reproduzierbarkeit klinischer Symptome einer B. cereus-Lebensmittelvergiftung	24
2.4	Vertreter des Genus Bacillus als Toxinbildner	25
2.4.1	Toxinbildung durch B. cereus	26
2.4.1.1	Nachweis der toxischen Aktivitäten in vivo und in vitro	26

2.4.1.2	Versuche zur Charakterisierung der toxischen Faktoren	27
2.4.2	Toxinbildung durch andere lebensmittelrelevante Bacillus-Species	31
2.5	Selektive Erfassung aerober Sporenbildner aus Lebensmitteln	33
2.5.1	Selektive Erfassung von Bacillus-Sporen	35
2.5.1.1	Medien und Methoden zur Erfassung von Bacillus-Sporen nach Angaben in der Literatur	35
2.5.2	Medien und Methoden zur Erfassung der Gesamtzahl aerober Sporenbildner nach Angaben in der Literatur	38
3.	Eigene Untersuchungen	46
3.1	Material	46
3.1.1	Definierte Kulturen	46
3.1.2	Lebensmittelproben	46
3.1.3	Eingesetzte Nähr- und Selektivmedien	52
3.1.4	Verdünnungslösungen	59
3.1.5	Homogenisierungsgerät	59
3.1.6	Wasserbäder	61
3.1.7	Reagenzien und Chemikalien	61
3.2	Methodik	61
3.2	Herstellung der verwendeten definierten Kulturen	61
3.2.2	Bestimmung der Keimzahl	61
3.2.3	Vergleichende Untersuchungen mit definierten Rein- und Mischkulturen	62
3.2.4	Erfassung von Bacillus-Sporen	64
3.2.5	Erfassung von Bazillen aus Lebensmitteln	65
3.3	Ergebnisse	70
3.3.1	Vergleichende Untersuchungen mit definierten Rein- und Mischkulturen	70
3.3.2	Erfassung von Bacillus-Sporen	80
3.3.3	Erfassung von Bazillen aus Lebensmitteln	86

4.	Besprechung der Ergebnisse	102
4.1	Brauchbarkeit gebräuchlicher Selektivmedien für die selektive Erfassung aerober Sporenbildner aus Lebensmitteln	102
4.2	Möglichkeiten zur Abgrenzung der Bazillen von der unerwünschten Begleitflora	103
4.3	Erfassung von Zielkeimgruppen innerhalb der Gattung Bacillus	105
4.4	Medien und Methoden zur Erfassung von Bacillus-Sporen	106
4.5	Eigene Erkenntnisse zur Isolierung von aeroben Sporenbildnern aus Lebensmitteln	108
4.6	Eigene Erkenntnisse zur Isolierung von Bacillus-Sporen aus Lebensmitteln	111
4.7	Vorschlag einer Methodenstrategie für die Untersuchung von Lebensmitteln auf aerobe Sporenbildner	114
4.7.1	Ermittlung der Gesamtzahl mesophiler aerober Sporenbildner sowie NaCl-toleranter Bacillus-Species und B. cereus aus Lebensmitteln mit dem Plattenkultivierungsverfahren	114
4.7.2	Ermittlung der Bacillus-Sporengehalte mit der MPN-Methode bzw. mit einer Plattenzählmethode	114
4.7.3	Anmerkungen zu den Methodenentwürfen	115
5.	Schlußfolgerungen	119
6.	Zusammenfassung	121
7.	Summary	124
8.	Literaturverzeichnis	126

Zusammenstellung häufig verwendeter Abkürzungen

COBA = Colistin - Oxolinic acid - Blood - Agar nach THOMPSON (1985)

EP = Eigelb - Pyruvat - Agar nach REUTER (1968)

EPM = EP mit 10,0 g Mannitol und 0,025 g Phenolrot /l

EPM$^-$ = EPM ohne Kaliumthiocyanat und Cycloheximid

EPMS = EPM mit 7% NaCl

KG = B. cereus - Selektivmedium nach KIM und GOEPFERT (1971)

KRANEP = Kaliumrhodanid - Actidione - Natriumazid - Eigelb - Pyruvat - Agar nach SINELL und BAUMGART (1967)

Kz = Keimzahl

LSD-Agar = Laktobazillen - Streptokokken - Differenzierungsmedium nach ELOY und LACROSSE (1976)

MPN-Technik = Most - Probable - Number - Technik

MRS-Bouillon = Lactobacillus - Bouillon nach DE MAN, ROGOSA und SHARPE (1960)

MYP = Mannitol - Egg yolk - Phenol red - Polymyxin - Agar nach MOSSEL et al. (1967)

MY = MYP ohne Polymyxin

PEMBA = Polymyxin - Pyruvate - Egg yolk - Mannitol - Bromthymol blue - Agar nach HOLBROOK und ANDERSON (1980)

PFHG-Agar = Pepton - Fleischextrakt - Hefeextrakt - Agar mit 0,1% Glukose nach REUTER (1968)

PFHG-Bouillon = Pepton - Fleischextrakt - Hefeextrakt - Bouillon mit 0,1% Glukose

TSB = Trypticase - Soy - Broth

WW = Bacillus - Germinationsmedium nach WALLEN und WALKER (1979)

1. Einleitung

Vertreter der Gattung Bacillus sind in der Umwelt weit verbreitet. Sie finden sich nicht nur im Boden, im Wasser und in der Luft, sondern auch in nahezu allen Lebensmitteln. Hier spielen sie sowohl für deren Verderb als auch als Ursache für Lebensmittelvergiftungen beim Menschen eine Rolle, falls es durch unsachgemäße Behandlung der Lebensmittel zu einer Vermehrung der ursprünglich niedrigen Bacillus-Kontaminationen kommt.

Die vielen Literaturangaben über das Vorkommen von Bazillen erstrecken sich vornehmlich auf Identifizierungen von Species und deren Häufigkeitsraten. Nur vereinzelt liegen auch gleichzeitig Angaben über die Höhe der Kontamination (Bazillengehalt pro g Lebensmittel) vor. Das mag daran liegen, daß bisher nur wenig brauchbare selektive Medien für die quantitative Erfassung von Bazillen aus einer vielschichtigen Lebensmittelflora verfügbar sind.

Für die quantitative Erfassung lebensmittelhygienisch wichtiger Keimgruppen gibt es seit längerem Standardisierungsbemühungen im Rahmen der ISO- und DIN-Arbeitsgruppen. Für die aeroben Sporenbildner liegen bisher nur ISO-Entwürfe für die Erfassung von B. cereus vor. Neben dieser Species, die schon seit längerem als Produzent enteropathogener Toxine bekannt ist, existieren auch noch andere Arten der Gattung Bacillus, die Lebensmittelvergiftungen verursachen können. Diese potentiellen Toxinbildner können bei der selektiven Untersuchung von Lebensmitteln bisher nur ungenügend berücksichtigt werden.

Eine weitere Problematik bei der Erfassung von Bazillen in Lebensmitteln stellt die Ausbildung der umweltresistenten Dauerformen, der Sporen, dar. So kann die Mikroflora von Lebensmitteln, die im Verlauf der Herstellung einer Trocknung und/oder Erhitzung unterworfen wurden, zum überwiegenden Teil aus Sporen bestehen. Diese können bei geeigneten Umweltbedin-

gungen, beispielsweise bei unsachgemäßer Lagerung, wieder auskeimen und zum Verderb des Lebensmittels führen oder zum Anlaß einer Lebensmittelvergiftung werden.

In der vorliegenden Arbeit sollten daher Methoden zur quantitativen Erfassung aerober Sporenbildner aus Lebensmitteln erarbeitet werden, wobei die potentiellen Toxinbildner besonders zu berücksichtigen waren. Ausgangspunkt für die Untersuchungen bildeten hierbei bereits verfügbare Selektivmedien und Methoden, die in vergleichenden Untersuchungen auf ihre Einsatzfähigkeit im Hinblick auf die Zielkeimgruppe geprüft werden sollten.

2. Literaturübersicht

2.1 Vorkommen von Bazillen in Lebensmitteln

Vertreter der Gattung Bacillus sind in der Umwelt weit verbreitet und können auch aus extremen Biotopen isoliert werden. So gehören Bazillen zu den normalen Bodenmikroorganismen (NORRIS et al., 1981) und werden sogar in sub-arktischen Böden gefunden (MARSHALL u. OHYE, 1966). Bei der Untersuchung von Boden-, Schlamm- und Wasserproben fanden LARKIN und STOKES (1966) Bacillus-Species, die bis -4 °C Wachstum zeigten. Versporung und Germination erfolgten noch bei 0 °C. Aus der Luft einer Süßwarenfabrik isolierten KUWABARA und UEDA (1980) aerobe Sporenbildner. Diese machten 76,6% der 402 bakteriellen Isolate aus.

Wegen der ubiquitären Verbreitung der Bazillen und durch die Ausprägung umweltresistenter Dauerformen, der Sporen, ist diese Gattung von großer ökonomischer Bedeutung für die Lebensmittelindustrie (GORDON, 1977). Die Bedeutung beruht einerseits auf einem enzymatisch bedingten Lebensmittelverderb (BERKEL, 1976), andererseits auf der Bildung von Toxinen, die beim Verbraucher Gesundheitsschäden hervorrufen können (TURNBULL, 1981).

Konservierende Maßnahmen verhüten eine Vermehrung von Bazillen nur bedingt. Bei vielen Species liegt die untere Wachstumstemperatur bei ca. 5 °C (GORDON, 1977), so daß selbst bei Kühltemperaturen eine Vermehrung nicht ganz ausgeschlossen werden kann. Auch in gefrorenem Fleisch können Bazillen überleben. SRIVASTAVA et al. (1981) isolierten aus gefrorenem Ziegenfleisch einen toxinbildenden Stamm von B. cereus. Auch Trocknung, Pasteurisierung oder die Verarbeitung zu Konserven kann die Kontamination eines Lebensmittels mit aeroben Sporenbildnern nicht immer beseitigen (KELCH, 1961; BLAKEY u. PRIEST, 1980; CERNY et al., 1984).

2.1.1 Bazillen in Fleisch und Fleischerzeugnissen

Bereits der Schlachttierkörper, also der Ausgangspunkt der Gewinnung von Fleisch und Fleischerzeugnissen, weist eine Kontamination mit Vertretern der Gattung Bacillus auf. HESS und LOTT (1970) führten Untersuchungen während verschiedener Schlachtphasen durch. Sie stellten fest, daß eine Obertragung der Keime von den Kontaminationsquellen Klauenschmutz, Kot und Fell durch Mensch und Gerät erfolgt. Nach Untersuchungen von Schafschlachtkörpern aus verschiedenen Stadien der Schlachtung vermuteten GILL et al. (1978) ebenfalls die Manipulation am Tierkörper als Kontaminationsquelle für B. cereus. FRIES und LENZ (1983) führten Stufenkontrollen in einem Geflügelschlachtbetrieb durch und fanden eine starke Erhöhung der aeroben Sporenbildner im Bereich der Evisceration, wobei jedoch nie mehr als 10^4 Bazillen pro g gefunden wurden.

Bei der Untersuchung von gefrorenem Rind- und Schweinefleisch sowie von Kalbfleisch konnten MOL und TIMMERS (1970) Bacillus-Sporen im Bereich von 10^2/g isolieren. In pasteurisierten Fleischprodukten fanden die Autoren bei der Differenzierung von Bacillus-Isolaten in über 50% der Fälle B. licheniformis. Weitere wichtige Species waren B. subtilis und B. cereus. Auch Halbkonserven von Fleischprodukten sind nicht frei von aeroben Sporenbildnern, wie die Untersuchungen von KELCH (1961) ergaben. BELL und DE LACY (1983) stellten fest, daß vielfach eine zu niedrige Erhitzungstemperatur der entscheidende Faktor für die Zusammensetzung der Mikroflora in Fleischkonserven ist, da zwischen Temperatur und Abtötungsrate eine logarithmische Beziehung besteht. Eine gleich lange Pasteurisierung bei 68,5 °C hatte auf die geprüften Mikroorganismen nur 70% der letalen Wirkung einer Erhitzung auf 70 °C (SHAPTON et al., 1971).

Bei der Untersuchung verschiedener Fleischerzeugnisse konnte eine deutliche Produktgebundenheit der Zusammensetzung der aeroben Mikroflora beobachtet werden. VON RHEINBABEN und HADLOK (1984) untersuchten zwischen 1969 und 1983 insgesamt 706 Proben von streichfähigen Rohwürsten, Rohschinken, Brühwürsten,

Leberwürsten, Blut- und Rotwürsten, Sülzwürsten, Sülzen und Fleischsalaten. Der aerobe Gesamtkeimgehalt lag überwiegend um 10^5/g, die aeroben Sporenbildner bewegten sich meist um 10^3/g, im Höchstfall bei knapp über 10^5/g. Der Anteil der mit Bazillen kontaminierten Proben lag bei den erhitzten Produkten (Brüh-, Leber-, Blut-/Roh- und Sülzwürste) zwischen 90 und 98%. Er war damit deutlich höher als bei den rohen Produkten. FRANKSEN et al. (1969) und KABUCZU et al. (1972) leisteten Beiträge zur Aufstellung von Normkeimzahlen und prüften zu diesem Zweck 100 Brühwürste bzw. 100 Leberwürste. In 93 Brühwürsten und in 98 Leberwürsten waren Bazillen nachzuweisen, es wurden jedoch keine Angaben über den absoluten Gehalt an aeroben Sporenbildner gemacht.

Verschiedene Autoren führten bei der Untersuchung von Fleischprodukten eine Speciesdifferenzierung der isolierten aeroben Sporenbildner durch. So untersuchte KELCH (1961) 50 Stämme aerober Sporenbildner aus Dosenschinken, die im Rahmen der Exportuntersuchung einer Haltbarkeitskontrolle unterworfen wurden. Die überragende Rolle mit 20 Stämmen spielte B. licheniformis, gefolgt von B. coagulans und B. pantothenicus (je 7 Stämme), B. stearothermophilus und B. laterosporus (je 5 Stämme) und B. subtilis (3 Stämme). Je ein Stamm wurde als B. circulans, B. badius und B. firmus identifiziert. Hervorzuheben ist, daß unter den 50 Stämmen die Species B. cereus nicht vertreten war.

Eine ähnlich unbedeutende Rolle spielte B. cereus bei den Untersuchungen von SCHEIBNER (1967), der bei der Prüfung von Brühwursthalbkonserven 45 Stämme aerober Sporenbildner isolierte und differenzierte. Bei seinen Untersuchungen konnten 17 Stämme B. subtilis zugeordnet werden, 6 Stämme erwiesen sich als B. licheniformis, je 3 Stämme als B. cereus bzw. B. firmus. B. coagulans und B. brevis waren mit je einem Stamm vertreten und 14 Isolate waren nicht einzuordnen.

Im Gegensatz zu den bisher angeführten Ergebnissen stehen die Resultate der Untersuchungen, die DELTSCHEW und SAWOW (1969) an Proben von 78 Dauerrohwürsten und 60 Dauerbrühwürsten

durchführten. Sie isolierten aerobe Sporenbildner aus allen Proben, wobei die Gehalte 10^4/g oft überschritten. Bei der Differenzierung von 373 Isolaten konnten 154 Isolate 13 verschiedenen Bacillus-Species zugeordnet werden. B. cereus war in diesem Fall mit einem Anteil von 32% die bedeutendste Species, gefolgt von B. subtilis (18%) und B. coagulans (10%).

Umfangreiche Differenzierungsversuche führten BERKEL und HADLOK (1976 a) an 420 Bacillus-Stämmen durch, die aus 165 Brüh- und Kochwurstproben isoliert worden waren. Nach Abzug der Mehrfachisolate blieben 293 Stämme, für die folgende Speciesverteilung ermittelt wurde: B. subtilis (37,6%), B. pumilus (32,4%) und B. licheniformis (17%) waren mit Abstand die am häufigsten vorkommenden Vertreter des Genus Bacillus. Auf B. cereus entfielen nur 5,5% der Stämme, die restlichen 6,9% verteilten sich auf 7 Species.

Als Quelle der Kontamination mit aeroben Sporenbildnern gaben PALUMBO et al. (1975) für die von ihnen untersuchten Wurstproben die enthaltenen Gewürze an. Die Autoren unterstrichen die Bedeutung von B. subtilis in den von ihnen untersuchten Proben.

2.1.2 Bazillen in Milch und Milcherzeugnissen

Für Milch und Milchprodukte besitzen aerobe Sporenbildner eine nicht unerhebliche ökonomische Bedeutung. Sie können bei Milch sowohl Geschmacksabweichungen (FRANKLIN, 1969) als auch Veränderungen der Konsistenz bewirken. So ruft B. cereus neben einer Milchgerinnung auch die Verderbserscheinung des sog. bitty cream hervor (BARKLEY u. DELANEY, 1980). AHMET et al. (1983) fanden B. cereus in roher und pasteurisierter Milch, Käse und Eiskrem, wobei die Kontaminationsrate unter 10^4/g lag.

Sogar aus "Sterilmilch" und ultrahoch-erhitzter Milch (UHT) konnten aerobe Sporenbildner isoliert werden. In der Sterilmilch dominierten B. cereus, B. licheniformis und B. pumilus. Bei den UHT-Produkten kam zu den genannten Species noch B. subtilis hinzu (MOSTERT et al., 1979).

MUKUNDAN et al. (1979) untersuchten abgekochte Milch und konnten Bacillus-Sporen nachweisen, wobei über die Hälfte der Isolate B. subtilis war, B. cereus war zu 14% beteiligt, weiterhin kamen B. pumilus, B. licheniformis, B. megaterium, B. alvei und B. firmus (in absteigender Reihenfolge) vor.

Auch gegen niedrige Lagertemperaturen erwiesen sich Vertreter der Gattung Bacillus als widerstandsfähig. So fanden JOHNSTON und BRUCE (1982), die Milchproben von 1040 schottischen Farmen untersuchten, in 27,2% der Proben hitzefeste psychrotrophe Mikroorganismen, von denen 85% Bazillen waren. Am häufigsten isolierten die Autoren B. cereus (66%). In bedeutender Zahl wurden weiterhin B. licheniformis, (20%) und B. coagulans (10%) gefunden.

Die Kältetoleranz von einzelnen Bacillus-Stämmen zeigt sich auch in der Tatsache, daß verschiedene Autoren aus Speiseeis aerobe Sporenbildner isolieren konnten (DOBBERTIN u. SIEMS, 1975; TAMMINGA et al., 1980).

CHOPRA und MATHUR (1984) untersuchten 145 Proben verschiedener Milchprodukte auf die Anwesenheit thermophiler Proteolyten. 50 von 171 gewonnenen Isolaten wurden ausgewählt und differenziert. Die Speciesverteilung war wie folgt: 29 Stämme waren B. stearothermophilus, 12 Isolate erwiesen sich als B. coagulans, B. circulans kam 5 mal vor und B. licheniformis 4 mal. Am häufigsten trat B. stearothermophilus in Milchpulver auf. Mit dieser Species waren 65% der Proben kontaminiert.

In den Niederlanden bewirkten auskeimende B. cereus-Sporen in den Jahren 1979 und 1980 Ausfälle in der Yoghurtproduktion. Ursache hierfür war eine Hemmung der Starterkulturen durch diesen aeroben Sporenbildner (DRIESSEN u. STADHOUDERS, 1980).

Bei der Untersuchung von Ziegen- und anderen Käseproben in Skandinavien wurde ebenfalls B. cereus gefunden (SMITH, 1979; DANIELSSON et al., 1980).

2.1.3 Bazillen in Reis

In Reis spielt die Species B. cereus eine wichtige Rolle. Sie kann in Reis ein Enterotoxin produzieren, das bisher in zahlreichen Fällen Lebensmittelvergiftungen mit einem von Erbrechen geprägten Krankheitsbild hervorgerufen hat. Aufgrund der entsprechenden Ernährungsgewohnheiten fanden Untersuchungen von Reis bisher vorwiegend im asiatischen Raum statt.

VIJAYALAKSHMI et al. (1981) prüften über 160 Proben von rohem und auf verschiedene Arten zubereiteten Reis. In mehr als 50% der Proben konnte B. cereus nachgewiesen werden.

Stichprobenuntersuchungen in sechs Chinesischen Restaurants zeigten, daß sowohl aus rohem Reis als auch aus allen Stufen der Zubereitung B. cereus isoliert werden konnte. Die Gehalte der einzelnen Proben lag dabei unter 10^3/g (BRYAN et al., 1981).

1974 untersuchten GILBERT et al. das Überleben und Wachstum von B. cereus-Stämmen in zubereitetem Reis. Sie konnten feststellen, daß Bacillus-Sporen nicht nur den Kochprozeß überlebten, sondern bei der anschließenden Lagerung auch zu Germination und Wachstum fähig waren.

2.1.4 Bazillen in Gewürzen

Auf die Bedeutung Bacillus-kontaminierter Gewürze bei der Herstellung von Fleischerzeugnissen wurde wiederholt hingewiesen (PALUMBO et al., 1975; HENNER et al., 1983; HEFNAVY et al, 1984). Unter diesem Gesichtspunkt wurde durch das Landesuntersuchungsamt Südbayern eine breit angelegte Untersuchung von 719 Gewürzproben durchgeführt (HARTGEN u. KAHLAU, 1985). Es zeigte sich, daß die Gesamtkoloniezahl im wesentlichen von Sporenbildnern bestimmt wurde, wobei die aeroben Sporenbildner dominierten. Als besonders stark kontaminiert erwiesen sich Schwarzer Pfeffer, Curry, Piment, Kardamom und Basilikum. Detaillierte Angaben über den Gehalt an aeroben Sporenbildnern machten die Autoren nicht.

MASSON und VANOS (1982) differenzierten 700 Einzelisolate aus 20 Gewürzproben und konnten folgende Bacillus-Species bestimmen: neben B. cereus traten B. alvei, B. firmus und B. coagulans auf.

Bei der Untersuchung von jeweils 25 Proben von Schwarzem Pfeffer, Rotem Pfeffer, Ingwer und Kurkuma isolierten SEENAPPA und KEMPTON (1981) vorwiegend B. cereus, B. subtilis, B. polymyxa und B. coagulans. Die Autoren wiesen nachdrücklich auf das potentielle Gesundheitsrisiko durch stark kontaminierte Gewürze hin.

2.1.5 Bazillen in Obst- und Gemüsekonserven

Wie bereits erwähnt, können Vertreter der Gattung Bacillus durch die Thermotoleranz ihrer Sporen die Erhitzung beim Herstellungsprozeß von Konservenprodukten überstehen. Obst- und Gemüsekonserven bilden hierbei keine Ausnahme. B. coagulans und B. stearothermophilus sind die Hauptursache der sog. flat-sour spoilage bei säuerlichen Konservenprodukten (FEIG und STERSKY, 1981). So konnten in Dosentomaten B. coagulans und B. stearothermophilus nachgewiesen werden (THOMPSON, 1981; MONTVILLE u. SAPERS, 1981). FEIG und STERSKY (1981) isolierten einen B. coagulans-Stamm mit hoher Hitzeresistenz aus Dosenmais. Bei einem Apfelfruchtnektar konnte ein aerober Sporenbildner als Verderbsursache ermittelt werden. Besonders auffällig war die ausgeprägte Acidophilie des isolierten Stammes, der sogar im extremen pH-Bereich des Produktes (pH 3,2) Wachstum zeigte (CERNY et al., 1984).

2.1.6 Bazillen in Gebäck, Snacks und Fertiggerichten

Küchen- und tischfertige Gerichte sowie Snacks nehmen in der Angebotspalette der Nahrungsmittelindustrie einen immer breiteren Raum ein. Durch die hohen Produktionszahlen waren diese Produkte wiederholt Gegenstand lebensmittelhygienischer Untersuchungen.

NIKODEMUSZ (1979) untersuchte 2800 derartige Lebensmittelproben auf eine Kontamination mit B. cereus und konnte in 100 Fällen diese Species isolieren. Dabei lag der Gehalt der Proben an B. cereus zwischen 10^3 und 10^6/g. 38% der positiven Lebensmittel war Gebäck mit Cremefüllung. Auch in Kürbiskuchen, die in verschiedenen Supermärkten gekauft wurden, fand sich B. cereus (WYATT u. GUY, 1981). Der D-Wert für B. cereus in Kürbiskuchen betrug bei 108° C 10,5 min. Während des Backvorganges wurde eine Kerntemperatur von 108° C jedoch nur für die Dauer von 1 min erreicht. Eine Abtötung des Keimes war also nicht möglich.

UEDA et al. (1981) isolierten aerobe Sporenbildner aus 51 von 60 küchenfertig panierten Lebensmitteln. Die wichtigsten nachgewiesenen Species waren dabei B. subtilis mit 55% und B. licheniformis mit 25% der Isolate. Nach dem Fritieren der Lebensmittel bei 170° C lagen die Bazillen in Reinkultur vor.

ETTEL (1982) konnte B. cereus bei der Untersuchung von 227 frisch zubereiteten Sandwiches und Canapees isolieren. Es erwiesen sich jedoch nur wenige Proben als kontaminiert.

2.1.7 Bazillen in Säuglings- und Kleinkindernahrung

Durch die Fähigkeit, Erhitzungs- und Trocknungsverfahren zu überleben, zählen aerobe Sporenbildner auch zu den Kontaminanten von Babynahrung verschiedenster Art. So wurden Bazillen sowohl in Milchnahrung als auch in anderen derartigen Produkten gefunden (SINGH et al., 1980; UEDA et al., 1980 b). Neben anderen Species wurden dabei immer wieder B. licheniformis, B. subtilis und B. coagulans nachgewiesen (GIBRIEL et al., 1980). Der Gehalt an aeroben Sporenbildnern in Säuglings- und Kleinkindernahrung lag jedoch selten über 10^2/g.

Ähnliche Ergebnisse erhielten BECKER et al. (1984), die 140 Proben von Säuglings- und Kleinkindernahrung untersuchten. Sie fanden in 54 Fällen B. cereus, und zwar stets in Gehalten unter 10^3/g. Alle Proben lagen somit unter der von der Verordnung für diätetische Lebensmittel für entsprechende Säuglings-

und Kleinkindernahrung festgelegten Obergrenze von $1,5 \times 10^3$ aeroben Sporenbildnern oder anderen Kaseolyten pro g. Die Autoren stellten jedoch fest, daß in unsachgemäß gelagerter, rekonstituierter Babynahrung bei Aufbewahrungstemperaturen von 25° C nach 9 Stunden Keimgehalte um 10^5/g erreicht werden konnten.

Auch bei "natürlicher" Ernährung des Säuglings ist eine Aufnahme von aeroben Sporenbildnern mit der Nahrung nicht auszuschließen. SINGH et al. (1984) berichteten über einen Fall B. cereus-haltiger Muttermilch. Der isolierte Stamm erwies sich als toxinogen.

2.1.8 Bazillen in Nährmitteln und Trockennahrungsmitteln

Bei Trockennahrungsmitteln stellen selbst niedrige Gehalte an aeroben Sporenbildnern ein potentielles Risiko dar. So berichteten BUTTIAUX und BEERENS (1968), daß Trockensuppen, die ursprünglich $1o^2$ B. cereus-Sporen pro g enthielten, nach der Zubereitung (Anrühren und 10 min Kochen nach Angaben des Herstellers) und 24-stündiger Lagerung bei Zimmertemperatur mehr als 10^6 vegetative Zellen pro ml aufwiesen.

BLAKEY und PRIEST (1980) untersuchten 39 Trockennahrungsmittel und konnten in 22 Proben B. cereus in Keimzahlen zwischen 10^2 und 6×10^4/g nachweisen. In bestimmten Hülsenfrüchten konnte sich dieser Keim nach dem Kochprozeß durch unsachgemäße Lagerung so vermehren, daß eine Toxinproduktion nicht mehr ausgeschlossen werden konnte.

Bei hygienisch einwandfrei gewonnenem Kakaopulver, das nach dem Rösten nicht kontaminiert wurde, besteht die Mikroflora ausschließlich aus Bacillus-Sporen (MEURSING u. SLOT, 1968). KOKUBO et al. (1982) wiesen Bacillus-Sporen in mehr als 50% von 42 untersuchten Stärkeproben nach.

UEDA et al. (1980 a) untersuchten Proben von Mehl und Mehlprodukten und konnten jeweils einen großen Anteil aerober Sporenbildner an der Gesamtflora ermitteln. Die dominierenden Species

waren B. subtilis und B. licheniformis, die je ein Drittel aller Bacillus-Isolate ausmachten.

In Fertigprodukten von Trockenzwiebeln fand CLAUS (1982) 10^3 bis 10^6 Bacillus-Sporen pro g Probe. In der Reihenfolge ihrer Häufigkeit isolierte er folgende Bacillus-Arten: B. subtilis (25%), B. licheniformis (23%), B. cereus (19%), B. pumilus (10%) und sonstige aerobe Sporenbildner (23%).

2.1.9 Bazillen in sonstigen Lebensmitteln

Neben den bisher genannten Produktgruppen können auch weitere Lebensmittel aerobe Sporenbildner enthalten. So wurden Species dieser Gattung aus verdorbenem Flüssigvollei und aus gelagerten hartgekochten Eiern isoliert (BOMAR, 1979; MACKENZIE u. SKERMAN, 1982). In den gekochten Eiern stellten Bazillen einen bedeutenden Anteil der Mikroflora dar.

MITAMURA et al. (1979) untersuchten Proben von 30 verschiedenen Honigsorten und konnten neben B. cereus B. megaterium, B. circulans, B. coagulans und B. subtilis isolieren.

Eine Kultur von B. megaterium wurde von MURRELL und RANKINE (1979) in auf Flaschen gezogenem australischen Brandy gefunden.

Auch bei der Untersuchung von frischer und gelagerter Margarine konnten Bazillen isoliert werden, nach Lagerung bei -20° C dominierte diese Gattung sogar (EL-GENDY et al., 1979).

THI SON und FLEET (1980) stellten fest, daß in Neu Süd-Wales gefischte Austern häufig mit geringen Gehalten an B. cereus kontaminiert waren.

Ein breites Spektrum aerober Sporenbildner fanden KONUMA et al. (1980) in Fleischextrakten aus verschiedenen Exportländern. Die wichtigsten isolierten Species waren dabei B. cereus, B. brevis und B. licheniformis.

2.2 Lebensmittelhygienisch relevante Bacillus-Species

Beim Vergleich der Literaturangaben kann man feststellen, daß zwar produktabhängige Unterschiede in der Speciesverteilung der aeroben Sporenbildner in Lebensmitteln bestehen, bestimmte Arten jedoch regelmäßig in der Gruppe der dominierenden Species erscheinen. Die zahlenmäßig stark verbreiteten Arten sind dabei zweifellos B. subtilis, B. licheniformis, B. cereus und B. pumilus, die den Anteil der aeroben Sporenbildner in einem Lebensmittel bestimmen. Bei verschiedenen Produkten kommt auch B. coagulans und B. stearothermophilus eine zahlenmäßige Bedeutung zu.

Auch in der ökonomischen Bedeutung der einzelnen Bacillus-Species gibt es Unterschiede. Hier ist zweifellos B. cereus als wichtigste Art zu nennen. Dieser Keim spielt nicht nur als Verderbserreger, besonders bei Milch und Milchprodukten, eine wichtige Rolle (FRANKLIN, 1969; BARKLEY u. DELANEY, 1980), sondern ist auch als Ursache für Lebensmittelvergiftungen bekannt (GILBERT u. KRAMER, 1984; JOHNSON, 1984). Als weitere Lebensmittelvergifter nannten KRAMER et al. (1982) B. subtilis, B. licheniformis und B. brevis.
Weiterhin sind B. coagulans und B. stearothermophilus von Bedeutung für die Lebensmittelindustrie. Diese Species sind als Ursache der sog. flat-sour spoilage bei Konservenprodukten bekannt.

2.2.1 Eigenschaften lebensmittelhygienisch relevanter Bacillus-Species

Wachstumstemperaturen

Die meisten Bacillus-Species gehören zu den mesophilen Mikroorganismen, die Extrema der Wachstumstemperaturen lebensmittelrelevanter Species liegen jedoch innerhalb weiter Grenzen. So liegt das Temperaturminimum für das Wachstum von B. subtilis und B. pumilus bei etwa 5 °C (GORDON, 1977), also durchaus im Kühllagerungsbereich von Lebensmitteln. Die höchsten Wachs-

tumstemperaturen weisen B. coagulans und B. stearothermophilus auf. Stämme von B. coagulans können noch bei Temperaturen bis 65 °C wachsen, Vertreter von B. stearothermophilus können sich noch bei Maximaltemperaturen von 75 °C vermehren (GORDON, 1977).

Hitze- und Kälteresistenz

Mit Ausnahme der thermophilen Species unterscheiden sich die vegetativen Zellen der aeroben Sporenbildner in ihrer Resistenz gegen erhöhte Temperaturen nicht wesentlich von anderen Mikroorganismen (CLAUS, 1982). Das Überleben von Erhitzungs- und Trocknungsprozessen beruht vielmehr auf der Umweltresistenz der gebildeten Sporen.
Ausdruck für die Hitzeresistenz von Mikroorganismen ist der D-Wert. Er gibt in Minuten die Zeit an, in der eine Population von Bakterien bei einer festgelegten Temperatur auf ein Zehntel ihrer ursprünglichen Keimzahl reduziert wird. Die jeweilige Temperatur für diese "decimal reduction time" wird als Index zu D geschrieben (SINELL, 1985). GILBERT et al. (1974) prüften Sporen verschiedener Stämme von B. cereus auf ihre Hitzeresistenz. Je nach Stamm wurden D_{90}-Werte zwischen 21 und 137 min ermittelt. Die D_{100}-Werte bewegten sich zwischen 1,2 und 7,5 min. BRIGGS (1966) nannte die folgenden D_{100}-Werte: B. subtilis 11,3 min, B. licheniformis 13,5 min und B. stearothermophilus 3000,0 min.
Die Hitzeresistenz von Sporen hängt von der Stärke der Cortex ab. Je dicker diese ist, desto ausgeprägter ist die Widerstandsfähigkeit der Spore. Die Beschaffenheit der Cortex wird von der Zusammensetzung des Sporulierungsmediums bestimmt. So fördert beispielsweise ein hoher Kalziumgehalt die Hitzeresistenz(BAYLISS et al., 1981).
Auch der pH-Wert der Umgebung beeinflußt die Hitzetoleranz von Sporen. EL-MABSOUT und STEVENSON (1979) stellten fest, daß ein niedriger pH zur Aktivierung von Sporen führte. Diese aktivierten Sporen zeigten eine deutlich niedrigere Thermotoleranz. 1981 konnten REYES et al. nachweisen, daß auch die Luftfeuchtigkeit bei Bacillus-Sporen einen Einfluß auf die Hitzeresistenz hatte. Die Widerstandsfähigkeit verringerte sich deutlich mit stei-

gender relativer Luftfeuchtigkeit. BELL und DE LACY (1985) untersuchten den Einfluß von NaCl auf die Hitzetoleranz und fanden, daß die Thermoresistenz von Sporen durch Kochsalz im Erhitzungsmedium erhöht wurde.

pH-Wert-Toleranz

Bei den meisten Bacillus-Species liegt der optimale pH-Bereich zwischen pH 6 und pH 8, fast alle Arten wachsen auch noch bei pH 5,7 (GORDON, 1977). B. stearothermophilus, B. licheniformis und B. subtilis wachsen bei pH-Werten über 4,5. Im noch niedrigeren Bereich liegen B. coagulans, B. polymyxa und B. macerans, die schon ab pH 4 Wachstum zeigen (CLAUS, 1982).

NaCl-Toleranz

Eine NaCl-Toleranz gehört zu den Kriterien der aeroben Sporenbildner. So wachsen B. cereus, B. licheniformis, B. subtilis, B. pumilus, B. firmus und B. megaterium noch bei 7% Kochsalz im Medium (GORDON et al., 1973). Stämme von B. subtilis können noch einen Kochsalzzusatz von 10% zum Medium tolerieren. Hierbei hängt die NaCl-Toleranz jedoch stark vom pH-Wert des Mediums ab (ANGERSBACH, 1970).
Die Kochsalzempfindlichkeit aktivierter Bacillus-Sporen ist unterschiedlich und speciesabhängig. So fanden COOK und GILBERT (1969), daß hitzeaktivierte B. stearothermophilus-Sporen durch 4,5%igen Kochsalzzusatz zum Medium am Auskeimen gehindert wurden. BRIGGS und YAZDANY (1970) untersuchten den Einfluß von NaCl auf die Ausbeute an Bacillus-Sporen nach Erhitzung. Sie stellten fest, daß auch eine milde Hitzebehandlung die Empfindlichkeit der Sporen gegenüber Kochsalz im Germinationsmedium erhöhte. Dieser Effekt konnte jedoch durch Erhitzung der Sporen in einem Medium mit erhöhtem NaCl-Gehalt abgeschwächt werden.

2.3 Vertreter des Genus Bacillus als Ursache von Lebensmittelvergiftungen

Bazillen gehören zu den unspezifischen Lebensmittelvergiftern (ESCHMENT, 1983). Unter diesem Begriff werden sog. opportunistische Bakterien zusammengefaßt, von denen einige Stämme unter bestimmten Voraussetzungen zu Lebensmittelvergiftern werden können. Dies kann beispielsweise durch die Entstehung pathogener Substanzen beim enzymatischen Abbau von Lebensmitteln geschehen.
So stellte HAUKE (1961) fest, daß die zahlreichen von Bazillen gebildeten Enzyme zu einer Zersetzung des untersuchten Wurstgutes führten. SCHEIBNER (1967) fand bei aus Brühwürsten isolierten Bacillus-Stämmen stark proteolytische Eigenschaften. Bei Milch führt die starke Aggressivität der Bazillen gegenüber Eiweiß zumeist zu einer Süßgerinnung (KUNDRAT, 1970).
Die zweite Ursache für unspezifische Lebensmittelvergiftungen sind toxisch wirkende Faktoren, die von den Keimen im Verlauf ihres Stoffwechsels gebildet werden. B. cereus, der wichtigste Verursacher von Lebensmittelvergiftungen unter den Bazillen, bildet mehr als 20 verschiedene Stoffwechselprodukte, darunter auch toxisch wirkende Substanzen, die an das Kulturmedium abgegeben werden (TURNBULL, 1981).

Für die Bildung enteropathogener Stoffwechselprodukte müssen verschiedene Voraussetzungen erfüllt sein. ESCHMENT (1983) gab folgende Bedingungen für die Entstehung unspezifischer Lebensmittelvergiftungen an:
Die entsprechenden Keime müssen in Mengen von über ca. 10^5/g Lebensmittel vorliegen.
Die Keime müssen einen Großteil der Lebensmittelflora ausmachen oder in Reinkultur vorliegen.
Die Keime müssen neben günstigen Wachstumsbedingungen auch genug Zeit zur Vermehrung haben. Das bedeutet meist, daß das Lebensmittel längere Zeit bei optimaler Wachstumstemperatur gehalten wird.
Die wichtige Rolle, die eine unsachgemäße Lagerung eines Lebensmittels für die Entstehung von Bacillus-Lebensmittelver-

giftungen spielt, erkannte bereits SCHÜNBERG (1949). Er forderte zur Verhinderung von Fäulnisintoxikationen durch Angehörige der "Mesentericus-subtilis-Gruppe" eine Kühlhaltung und sachgemäße Aufbewahrung der Lebensmittel.

2.3.1 Kasuistik

Die erste Beschreibung einer Lebensmittelvergiftung durch aerobe Sporenbildner gab LUBENAU (1906). Es erkrankten 300 Patienten eines Sanatoriums nach Genuß von Königsberger Klopsen. Dieser und auch andere Berichte über Lebensmittelvergiftungen durch aerobe Sporenbildner aus der ersten Hälfte dieses Jahrhunderts wiesen einige Lücken auf. So wurde selten eine Beschreibung des meist als "anthracoid" oder Mitglied der "Subtilis-mesentericus-Gruppe" bezeichneten Stammes gegeben. Auch der entsprechende Keimgehalt der inkriminierten Lebensmittel wurde nicht angeführt.

Die erste klassische Beschreibung von vier Lebensmittelvergiftungen mit über 600 Erkrankten in Norwegen gab HAUGE (1950). In allen Fällen war Gemeinschaftsverpflegung der Auslöser. Nur in einem Fall wurde die Bazillenzahl in den beteiligten Lebensmitteln bestimmt, die zwischen $2{,}5 \times 10^7$ und $1{,}1 \times 10^8$/g lag. Bei den Verpflegungsteilnehmern traten 10 bis 12,5 Stunden nach dem Verzehr Bauchschmerzen, Durchfall, Übelkeit und selten Erbrechen auf. Die Symptome dauerten selten länger als 12 Stunden an. Als Grund für die von ihm 1950 beschriebenen Fälle von Lebensmittelvergiftung gab HAUGE (1955) unsachgemäße Lagerung der Nahrungsmittel an. Er forderte, Gemeinschaftsverpflegung erst kurz vor dem Verzehr zuzubereiten oder schnell auf eine niedrige Lagertemperatur abzukühlen.

Eine Lebensmittelvergiftung mit ähnlichen Charakteristika beschrieben CHRISTIANSEN et al. (1951). In einer Ferienkolonie erkrankten 121 Personen nach dem Genuß einer unsachgemäß gelagerten Puddingspeise. Aus dem Lebensmittel wurden $1{,}3 \times 10^7$ B. cereus pro g isoliert.

Mit der Beschreibung einer durch B. cereus hervorgerufenen Massenerkrankung in einem ungarischen Betrieb wollte NIKODEMUSZ (1958) die Aufmerksamkeit der Fachwelt auf diesen Keim lenken. Er isolierte aus der verzehrten Gemüsesuppe 10^7 B. cereus pro g und macht die proteolytische Fähigkeit dieser Species für die Erkrankung verantwortlich.

Auch SCHÖNBERG und KÖNEKAMP (1962) sahen die unspezifische Lebensmittelvergiftung als Fäulnisintoxikation an, die durch temperaturabhängige Proteolyse von B. cereus und B. subtilis hervorgerufen wird. Als pathogenes Agens vermuteten die Autoren neben Muscarin und Neurin besonders Histamin. Als wichtigen Faktor für die krankmachende Wirkung aerober Sporenbildner sahen die Autoren die Empfänglichkeit der betreffenden Personen an.

Auf prädisponierende Faktoren bei unspezifischen Lebensmittelvergiftungen durch Bazillen wies auch REUSSE (1962) hin. Er berichtete über einen Erkrankungsausbruch durch B. cereus bei der Bundeswehr. Ein Teil der Soldaten hatte vor der Mahlzeit an einer anstrengenden Geländeübung teilgenommen und erkrankte ausnahmslos. Von den übrigen Verpflegungsteilnehmern zeigten nur 4% Symptome.

Aus zwei von ihm beschriebenen Fällen einer mit Erbrechen einhergehenden B. cereus-Lebensmittelvergiftung schloß BODNAR (1962), daß auch Kinder eine erhöhte Empfindlichkeit gegen nicht spezifische Krankheitserreger haben.

1962 veröffentlichten NIKODEMUSZ et al. eine erste Übersicht von in Ungarn diagnostizierten Lebensmittelvergiftungen durch aerobe Sporenbildner. Es erkrankten binnen drei Jahren mehr als 1200 Personen bei 51 Ausbrüchen. Die Zahl der isolierten Sporenbildner lag dabei zwischen 10^5 und 10^9/g. Der Autor hielt demzufolge Lebensmittel mit einem Bazillengehalt von 10^5/g schon für bedenklich. Die bei den Ausbrüchen isolierten Spezies waren neben B. cereus B. alvei, B. laterosporus und B. subtilis. Der Krankheitsverlauf war in den meisten Fällen mild.

Aus zwei weiteren Übersichten über die Ätiologie der Lebensmittelvergiftungen in Ungarn (NIKODEMUSZ et al., 1967; NIKO-

DEMUSZ, 1968) ist abzulesen, daß aerobe Sporenbildner bei ca. 5% aller Fälle der Auslöser waren. Die dominante Rolle spielte hier B. cereus. Todesfälle waren nicht zu verzeichnen.

Im Gegensatz dazu berichtete TEMPER (1963) über einen Todesfall durch eine B. cereus-Lebensmittelvergiftung. Ein einjähriges Kleinkind war nach dem Genuß kontaminierter Leberwurst verstorben.

ELTER (1966) beschrieb eine Lebensmittelvergiftung durch Bockwürste, die B. sphaericus in einer Menge von 8,3 x 10^5/g enthielten und vor dem Verkauf unsachgemäß gelagert worden waren.

ORMAY und NOVOTNY beschäftigten sich 1970 mit der ungarischen Statistik der unspezifischen Lebensmittelvergiftungen. Mit jeweils fast 50% der Ausbrüche und Patienten hatten aerobe Sporenbildner den Hauptanteil an diesen Erkrankungen. Bei den auslösenden Lebensmitteln standen Fleischspeisen und Fleischprodukte an erster Stelle.

Nachdem vorher nur wenige Fälle von B. cereus-Lebensmittelvergiftungen in den USA dokumentiert worden waren, berichteten MIDURA et al. (1970) von einem Krankheitsausbruch in einer Studentenverbindung. Sie vertraten die Auffassung, daß bei durch Lebensmittel verursachten Gastroenteritiden eine genaue Bestimmung von Art und Zahl der beteiligten Mikroorganismen zu einer verstärkten Erkennung von B. cereus-Lebensmittelvergiftungen führen würde.

LUDWIG (1971) berichtete über einen weiteren Fall einer Lebensmittelvergiftung durch aerobe Sporenbildner bei der Bundeswehr. Ursache war hier eine am Tag vor dem Verzehr hergestellte Vanillesoße, die bei der Untersuchung einen B. cereus-Gehalt von 10^7/g aufwies.

Seit 1971 traten in Großbritannien Fälle von B. cereus-Lebensmittelvergiftungen mit emetischem Symptomenkomplex auf. GILBERT und TAYLOR (1975) faßten verschiedene Angaben zu diesen Fällen zusammen. Das klinische Bild wurde durch eine 12- bis 24-stündige Erkrankung mit Schwindelanfällen und Erbrechen bestimmt. Die Inkubationszeit war ziemlich kurz und

betrug zwischen 1 und 5 Stunden. Als auslösendes Lebensmittel wurde Reis aus Restaurantmahlzeiten bestimmt, der B. cereus in Keimzahlen von 3 x 10^5 bis 2 x 10^9/g enthielt. Als begünstigende Faktoren für die Vermehrung dieses Keims wurden die Zubereitungsgepflogenheiten in Selbstbedienungs- und Chinarestaurants genannt. Der in großen Portionen gekochte Reis wird hier bis zu drei Tagen aufbewahrt, evtl. mit geschlagenem Ei oder Öl gebraten und vor dem Verzehr abschließend erhitzt. Diese Umstände schaffen ideale Voraussetzungen für das Auskeimen von Sporen, die den Kochprozeß überlebt haben.

RAEVUORI et al. (1976) beschrieben eine Lebensmittelvergiftung durch B. cereus mit emetischem Symptomenkomplex, die nach extrem kurzer Inkubationszeit von nur 30 min auftrat. Auch hier war Reis das auslösende Lebensmittel.

KATSARAS und HILDEBRANDT (1979) verglichen die durch B. cereus ausgelösten Krankheitsbilder mit den Symptomen anderer bakterieller Lebensmittelintoxikationen. Nach Ansicht der Autoren konnte man das Erbrechen-Syndrom aufgrund der Inkubationszeit von nur wenigen Stunden mit der Staph. aureus-Intoxikation vergleichen, während das Diarrhoe-Syndrom den Symptomen der Cl. perfringens-Intoxikation ähnelte.

GILBERT et al. (1981) setzten die Serotypisierung zum Studium von B. cereus-Lebensmittelvergiftungen ein. Bei der Untersuchung von Isolaten aus 107 Ausbrüchen des Erbrechen-Syndroms in sechs Ländern ergab sich 65 mal der Serotyp 1 allein und 10 mal in Verbindung mit anderen Serotypen. Diese Ergebnisse deckten sich mit der Erkenntnis, daß sich der Anteil dieses Serotyps im Reis durch den Kochprozeß von 3% auf 23% steigerte. Die Autoren machten auch Angaben über weitere an Lebensmittelvergiftungen beteiligte Bacillus-Species und nannten neben B. subtilis B. licheniformis und B. brevis.

BODNAR und NIKODEMUSZ (1981) berichteten über fünf Bacillus-Intoxikationen, die im Gegensatz zu den meist milde verlaufenden Fällen sehr schwere Symptome zeigten. 9 der 12 Erkrankten waren Kinder, 3 davon mußten wegen Koma stationär behandelt werden. Auslösender Keim war in vier Fällen B. cereus,

einmal war B. laterosporus die Ursache. HADLOK (1983) stellte verschiedene Literaturangaben über B.-Lebensmittelvergiftungen zusammen, die nicht durch B. cereus hervorgerufen wurden. Er führte 19 Fälle an, bei denen neben ganzen Gruppen innerhalb der aeroben Sporenbildner ("Sphaericus-Gruppe" usw.) auch B. licheniformis, B. subtilis, B. alvei, B. laterosporus, B. pumilus, B. brevis, B. pantothenicus und B. sphaericus als Ursache angegeben wurden. Der Autor stellte fest, daß diese Fälle sowohl in der Symptomatik als auch im Typ der auslösenden Lebensmittel der B. cereus-Intoxikation vom Diarrhoe-Typ glichen.

ESCHMENT (1983) untersuchte 2 Fälle von B. cereus-Intoxikationen. In einem Fall erkrankten 920 Personen am Erbrechen-Syndrom, im zweiten Fall zeigten 70 Personen Symptome des Diarrhoe-Syndroms. In beiden Fällen konnte B. cereus in großer Zahl nicht nur aus den verzehrten Mahlzeiten, sondern auch von verschiedenen Stufen des Herstellungsprozesses isoliert werden. Die Autorin nahm an, daß unspezifische Lebensmittelvergiftungen wesentlich häufiger auftreten, als die statistisch erfaßten Fälle annehmen lassen. Sie macht dafür neben der milden Symptomatik das häufige Fehlen von Speiseresten für die Untersuchung und die unbefriedigenden Ergebnisse bei Untersuchungen von Rohprodukten verantwortlich.

SCHULZE und ZIMMERMANN (1983) wiesen im Zusammenhang mit der Untersuchung von Lebensmittelvergiftungen auf die Wichtigkeit eines detaillierten Vorberichtes hin. So führe ein guter Vorbericht bei einer B. cereus-Intoxikation zu einer gezielten Untersuchung.

FENTON et al. (1984) berichteten über eine Lebensmittelvergiftung durch Vanilleschnitten, die neben Staph. aureus (1,3 x 10^9/g) B. cereus und B. subtilis (bis 2,6 x 10^6/g) enthielten. Ungewöhnlich war hier die extrem kurze Inkubationszeit von 15 min, nach der Durchfall und Erbrechen auftraten.

BECKER et al. (1984) faßten in einer Obersichtstabelle B. cereus-Intoxikationen zusammen, bei den in den inkriminierten Lebensmitteln nur relativ geringe Gehalte dieses Keims gefun-

den wurden. Neben den bereits erwähnten Fällen in Ungarn (BODNAR, 1962; NIKODEMUSZ, 1962) wurden vier weitere Fälle mit Keimzahlen zwischen 10^3 und 10^7/g Lebensmittel aufgeführt. Besonders betroffen waren auch hier wieder Kinder und Klinikpatienten.

2.3.2 Klinische Charakteristika für einzelne Bacillus-Species

KRAMER et al. (1982) faßten die Angaben über 11 Fälle von B. licheniformis-Lebensmittelvergiftungen zusammen. Die Inkubationszeiten bewegten sich zwischen 4 und 15 Stunden. Die anschließend auftretenden Symptome wurden vorwiegend durch Diarrhoe geprägt, nur in wenigen Fällen dominierte Erbrechen. Die inkriminierten Lebensmittel waren überwiegend gekochte Fleischgerichte, die zwischen 10^5 und 10^9 B. licheniformis pro g enthielten.

B. subtilis-Lebensmittelvergiftungen wurden in 9 erfaßten Fällen (KRAMER et al., 1982) von Erbrechen bestimmt, welches teilweise von Diarrhoe begleitet wurde. Die Inkubationszeit war manchmal erstaunlich kurz (zwischen 15 und 90 min), konnte aber auch bis zu 10 Stunden betragen. Auffallend war, daß B. subtilis oft in sehr hohen Keimzahlen über 10^6/g und fast in Reinkultur auftrat.

B. brevis-Lebensmittelvergiftungen wurden in vier Fällen erfaßt, wobei dieser Keim in hohen Zahlen entweder allein oder zusammen mit B. cereus vorlag. Nach 1 bis 9,5 Stunden Inkubationszeit traten Erbrechen und Durchfall zusammen auf (KRAMER et al., 1982).

Lebensmittelvergiftungen durch weitere Bacillus-Species lösten Symptome aus, die der B. cereus-Intoxikation vom Diarrhoe-Typ glichen (HADLOK, 1983).

B. cereus-Lebensmittelvergiftungen können zwei verschiedene Symptomenkomplexe auslösen. GILBERT (1979) stellte deren Charakteristika ähnlichen Syndromen mit bakterieller Genese gegenüber (Tab. 1).

Tabelle 1 : Food poisoning caused by Clostridium perfringens, Bacillus cereus, and Staphylococcus aureus: Some clinical and epidemiological data (GILBERT, 1979)

Variable	Cl. perfringens	B. cereus[a]	B. cereus[b]	Staph. aureus
Incubation period (hr)	8 - 22	8 - 16	1 - 5	2 - 6
Duration of illness (hr)	12 - 24	12 - 24	6 - 24	6 - 24
Diarrhea	Extremly common	Extremly common	Fairly common	Common
Vomiting	Rare	Occasional	Extremly common	Extremly common
Foods most frequently implicated	Cooked meat and poultry	Meat products, soups, vegetables, puddings and sauces	Fried rice from Chinese restaurants	cooked meat and poultry and dairy products

[a] Outbreaks reported since 1950 in several countries including Norway, Denmark, Italy, the Netherlands, Hungary, Sweden, Poland, Rumania, the U.S.S.R., the United States, Germany, and Canada

[b] Outbreaks reported since 1971 in Great Britain, Canada, Australia, the Netherlands, Finland, the United States and Japan

2.3.3 Reproduzierbarkeit klinischer Symptome von Bacillus-Lebensmittelvergiftungen

Im Anschluß an beobachtete B. cereus-Lebensmittelvergiftungen gelang es HAUGE (1950), bei Freiwilligen durch Verabreichung einer Dessertsoße mit 3 bis 6 x 10^7 B. cereus/ml reproduzierend Symptome einer Lebensmittelvergiftung hervorzurufen. Nach 8 bis 16-stündiger Inkubationszeit traten Bauchschmerzen, Übelkeit und Durchfall auf.

DACK et al. (1954) waren bei ähnlichen Versuchen nicht erfolgreich. B. cereus-Zellsuspensionen sowie künstlich kontaminierte Milch und Vanillesoße verursachten keine klinischen Symptome.

1955 gelang es HAUGE im Selbstversuch erneut, mit kontaminierter Vanillesoße (9,2 x 10^7 B. cereus/ml) eine Lebensmittelvergiftung zu produzieren. Der Erreger konnte von ihm auch aus Stuhlproben isoliert werden.

NIKODEMUSZ und GONDA (1963) untersuchten die pathogene Wirkung der aeroben Sporenbildner bei Nagetieren und stellten fest, daß nur B. cereus-Stämme bei parenteraler Verabreichung eine besondere Nagetierpathogenität aufwiesen. Zur Reproduktion von menschlichen Lebensmittelvergiftungen nach oraler Aufnahme aerober Sporenbildner waren Ratte und Laboratoriumsmaus nicht geeignet. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, daß bei oraler Infektion dieser Tiere mit B. cereus dieser Keim für eine gewisse Zeit mit den Exkrementen ausgeschieden wird.

NIKODEMUSZ (1965) setzte seine Fütterungsversuche mit B. cereus an Katzen fort. Er konnte bei diesen Tieren Erscheinungen hervorrufen, die den Symptomen der menschlichen Lebensmittelvergiftung ähnelten. Bei jungen Tieren trat nach Aufnahme kontaminierter Nahrung Durchfall auf, der selten länger als 36 Stunden anhielt. Die Erregerausscheidung mit dem Kot dauerte über mehrere Tage an. Erbrechen konnte nur in Einzelfällen beobachtet werden.

Bei weiteren Fütterungsversuchen mit Hunden konnte NIKODEMUSZ (1967) feststellen, daß auch diese, ähnlich wie Katzen, nach Aufnahme von B. cereus mit dem Futter für 24 bis 48 Stunden die Symptome einer Lebensmittelvergiftung zeigten.

NIKODEMUSZ et al. (1969) führten mit freiwilligen Versuchspersonen Tests zur enteropathogenen Wirkung von B. cereus durch. Die Auslösung einer Lebensmittelvergiftung durch Aufnahme einer Keimsuspension gelang nicht.

HELLMANN (1972) führte Fütterungsversuche mit hitzeabgetötetem Bacillus-Kulturmaterial durch. Nach Trypsinbehandlung führte dieses nach peroraler Verabreichung bei Mäusen zu schwerer Erkrankung mit Durchfall und letalem Ausgang.

BALALESCU (1974) überprüfte in einem Selbstversuch die enterale Wirkung von B. cereus-Stoffwechselprodukten. Es gelang ihm durch Aufnahme eines Kulturfiltrates nicht, die Symptome einer Lebensmittelvergiftung hervorzurufen, obwohl er im Gegensatz zu NIKODEMUSZ et al. (1969) die parenterale Toxizität dieses Filtrates für Mäuse nachgewiesen hatte.

2.4 Vertreter des Genus Bacillus als Toxinbildner

BONVENTRE (1970) definierte mikrobielle Toxine als eine spezielle Art von Giften, die durch ihre mikrobielle Herkunft, eine Proteinstruktur, hohes Molekulargewicht und Antigeneigenschaften gekennzeichnet sind.

STEPHEN und PIETROWSKI (1981) beschrieben bakterielle Toxine als solche Substanzen, die unter ganz bestimmten ökologischen Bedingungen gebildet werden und Schäden an Zellen, Geweben oder im Organismus bewirken und dadurch Krankheiten auslösen oder begünstigen.

Für bestimmte Bacillus-Stoffwechselprodukte wird in der Literatur immer wieder der Terminus "Toxin" verwendet (MOLNAR, 1962; JOHNSON u. BONVENTRE, 1967; HELLMANN, 1972; MELLING et al., 1978; GILBERT u. KRAMER, 1984). In der folgenden Obersicht wird daher dieser Begriff verwendet, obwohl eine befriedigende Charakteri-

sierung der zahlreichen Einzelstoffe noch nicht vorliegt und die Zuordnung von klinischen Auswirkungen zu definierten Bacillus-Stoffwechselprodukten noch nicht ausreichend gesichert ist.

2.4.1 Toxinbildung durch B. cereus

2.4.1.1 Nachweis der toxischen Aktivitäten in vivo und in vitro

MOLNAR (1962) wies erstmals toxische Aktivitäten im Kulturfiltrat von B. cereus nach. Im Mäuse-Letalitätstest zeigte sich eine tödliche Wirkung, und zwar sowohl nach i.v.- als auch nach intraperitonealer Applikation. Da der Mäusetest auch weiterhin als Nachweismethode für diesen Faktor zur Anwendung kam, wurde als Synonym oft "Letaltoxin" oder "lethal factor" benutzt. Im Meerschweinchen-Hauttest, den die Autorin ebenfalls zum Toxinnachweis anwendete, zeigten sich nach intradermaler Injektion umschriebene Entzündungen mit anschließender Nekrose.

SPIRA und GOEPFERT (1972) prüften, ob der Kaninchen-Darmschlingentest mit Flüssigkeitsansammlung in den ligierten Darmschlingen als System zur Toxizitätsbestimmung bei B. cereus-Kulturfiltraten einsetzbar wäre. Sie stellten fest, daß die Stärke der Darmschlingenreaktion von den Kultivierungsbedingungen der zu überprüfenden Stämme und vom Alter der Versuchstiere abhing.

GLATZ und GOEPFERT (1973) verglichen Meerschweinchen-Hauttest und Kaninchen-Darmschlingentest. Sie stellten fest, daß beide toxischen Wirkungen gut miteinander korrelierten und nahmen an, daß der gleiche Faktor für beide Reaktionen verantwortlich war. Als Vorteile des Hauttests wurde neben der einfachen Durchführbarkeit die niedrige Nachweisgrenze genannt.

GLATZ et al. (1974) konnten aufzeigen, daß intradermale Injektion von B. cereus-Kulturfiltraten bei Kaninchen eine gesteigerte Permeabilität der Gefäße um die Injektionsstelle bewirkte. Die Größe der betroffenen Hautzone, die durch i.v.-Injektion von Evans blue sichtbar gemacht werden konnte, war proportional zur eingesetzten Filtratmenge. Der Kaninchen-Hauttest wurde aufgrund

seiner Unkompliziertheit, Verläßlichkeit und Kostengünstigkeit als Methode der Wahl zum Screening von Kulturen empfohlen.

STRETTON und BULMAN (1975) führten experimentelle Infektionen von Kaninchen mit B. cereus-Zellen durch. Nach intramuskulärer oder subcutaner Injektion traten Entzündungserscheinungen mit anschließenden nekrotischen Prozessen auf.

KATSARAS und ZELLER (1977) wiesen B. cereus-Stoffwechselprodukte in verschiedenen Versuchsansätzen nach. Neben den biochemischen Aktivitäten (Hämolyse und Phospholipase) wurden im Tierversuch auch die biologischen Aktivitäten geprüft. Dazu wurde der Mäuse-Letalitätstest sowie der Intrakutan- und Darmschlingentest durchgeführt. Dabei zeigte sich wie bei GLATZ et al. (1974), daß der Hauttest gegenüber der Darmschlingenmethode durch einfache technische Durchführbarkeit überlegen war.

GORINA et al. (1975) prüften erstmals den in vitro - Nachweis des B. cereus-Toxins mit der Aggregat-Haemagglutinationstechnik. Die Nachweisgrenze lag mit 0,004 µg/ml um mehrere Zehnerpotenzen unter der Grenze von 15 mg/kg im Tierversuch mit Mäusen. Die Aggregat-Haemagglutinationstechnik erwies sich auch für die Untersuchung von Lebensmitteln als brauchbar.

THOMPSON et al. (1984) verwendeten zum Nachweis des toxischen Faktors im B. cereus-Kulturfiltrat die Gewebekultur.

GILBERT und KRAMER (1984) führten in ihrer Bestandsaufnahme des aktuellen Kenntnisstandes über die B. cereus-Toxine die Immuno-Gel-Diffusion als weitere in vitro-Nachweistechnik auf.

Ein von MELLING et al. (1976) erstmals beschriebener emetischer Faktor von B. cereus ist bisher nur im Fütterungsversuch mit Affen nachweisbar. Versuche mit dem Kaninchen-Darmschlingentest verliefen negativ (MELLING et al., 1978).

2.4.1.2 Versuche zur Charakterisierung der toxischen Faktoren

MC GAUGHEY und CHU (1948) untersuchten Vertreter der Gattung Bacillus auf Eigelbreaktion und Hämolyse, um eventuelle Ähnlichkeiten mit dem Cl. perfringens-Toxin zu überprüfen. Eine opali-

sierende Trübung fester bzw. Ausflockung flüssiger Eigelbmedien bewirkten unter 24 Species nur Stämme von B. cereus, B. mycoides und B. anthracis. Diese Eigelbreaktion wurde durch eine Phospholipase bewirkt. Die Autoren konnten die Lecithin-Spaltprodukte Phosphocholin und ein Diglycerid nachweisen. Weiterhin zeigte sich, daß, ähnlich wie bei Cl. perfringens, zwischen Eigelbreaktion und Hämolyse auf Blutagar ein Zusammenhang bestand. Alle Phospholipasebildner waren auch hämolytisch. Die Autoren empfahlen die Lecithinasebildung als Leitkriterium zur Bacillus-Differenzierung und zur schnellen Erfassung von B. cereus aus Mischkulturen.

NYGREN (1962) vermutete bei B. cereus einen Zusammenhang zwischen Lecithinase und Enteropathogenität. Diese These wurde damit begründet, daß die von B. cereus gebildete Lecithinase aus Lecithin Phosphorylcholin bildet. Phosphorylcholin verursachte bei Versuchstieren eine verkürzte Darmpassage der Nahrung und speziell bei Affen auch wäßrigen Kot. Daraus wurde geschlossen, daß bei B. cereus wahrscheinlich die Lecithinase als indirekte Ursache der enteropathogenen Wirkung zu sehen ist.

MOLNAR (1962) untersuchte erstmals B. cereus-Kulturfiltrate. Sie konn e nachweisen, daß die Phospholipase allein im Tierversuch keine letale Wirkung hat. Nach Säulenchromatographie eines Kulturfiltrates konnten durch Elution mit Phosphatpuffer zwei Komponenten gewonnen werden. Diese wurden als "Faktor I" und "Faktor II" bezeichnet und auf toxische und Phospholipaseaktivitäten geprüft. Es zeigte sich, daß die Eigelbreaktion von Faktor I bewirkt wurde, die letale Wirkung im Tierversuch jedoch nur mit einer Mischung aus beiden Faktoren zu erzielen war.

SLEIN und LOGAN (1963) konnten neben der bereits bekannten Phospholipase von B. cereus ein weiteres Enzym mit Phospholipaseaktivität nachweisen. 1965 stellten die gleichen Autoren fest, daß die Lecithinase-Eigenschaften von B. cereus auf eine ganze Gruppe von Phospholipasen zurückzuführen waren, die sich hinsichtlich ihrer Substratspezifität und Trypsinresistenz unterschieden. Die Autoren unterstrichen die Unabhängigkeit der Phospholipase von anderen Aktivitäten von B. cereus.

JOHNSON und BONVENTRE (1967) prüften die Beziehungen zwischen Mäuse-Letalfaktor, Phospholipase und Hämolysin aus B. cereus-Kulturfiltraten. Durch Anwendung von Hitze, Alkohol oder Trypsin konnte jeweils eine Aktivität unterdrückt werden. Die Gel-Filtration zeigte, daß Phospholipase, Hämolysin und Letalfaktor einzelne Proteine waren, obwohl es nicht gelang, die drei Fraktionen vollständig voneinander zu trennen.

KRIEG (1970) konnte nachweisen, daß der Mäuseletalfaktor von B. cereus thermolabil ist. Weiterhin konnte er durch Immunisierung der Versuchstiere eine Reduktion der Mortalität erzielen.

HELLMANN (1972) warf die Frage auf, ob aerobe Sporenbildner durch Trypsin aktivierbare Endotoxine enthalten. Im Gegensatz zu JOHNSON und BONVENTRE (1967), die mit Kulturfiltraten arbeiteten, konnte er die Mäusetoxizität hitzeabgetöteter Bacillus-Kulturen durch Trypsinverdauung erheblich steigern. Nach der Behandlung mit Trypsin hatten die Kulturen auch nach oraler Applikation eine letale Wirkung.

BALALESCU (1975) konnte aufzeigen, daß von B. cereus in der logarithmischen Wachstumsphase ein "lethal factor" an das Kulturmedium angegeben wurde, der eine hohe Toxizität für Nager aufwies. Weiterhin stellte er fest, daß dieser Faktor hitzelabil war und bei Temperaturen über 65 ^{o}C inaktiviert wurde.

BERKEL und HADLOK (1976 b) versuchten, mögliche Zusammenhänge zwischen Lecithinase- und Toxinbildung der Gattung Bacillus aufzudecken. Sie vermuteten daß ohne die Fähigkeit zur Lecithinasebildung auch das Toxinbildungsvermögen fehlt. 77 Stämme der Species B. cereus, B. subtilis, B. licheniformis und B. pumilus wurden auf ihr Lecithinasebildungsvermögen untersucht. Es zeigte sich, daß nicht alle geprüften B. cereus-Stämme Lecithinase-positiv waren. Die Autoren regten Untersuchungen zur prinzipiellen Kopplung zwischen Lecithinase- und Toxinbildung an.

1976 isolierten MELLING et al. erstmals einen B. cereus-Stamm bei einer Lebensmittelvergiftung, deren Leitsymptom Erbrechen war. Bei weitergehenden Untersuchungen zeigte sich, daß die Produktion eines emetischen Symptomenkomplexes an das Kulturmedium Reis gebunden war.

1978 veröffentlichten MELLING et al. weitere Erkenntnisse über den emetischen Faktor von B. cereus. Er erwies sich als sehr hitzestabil, relativ unempfindlich gegen extreme pH-Werte und war durch Pepsin und Trypsin nicht angreifbar. Diese Eigenschaften unterschieden ihn deutlich vom Diarrhoe-Faktor und befähigten zum Oberleben von Koch- und Aufwärmprozessen.

KRAMER et al. (1978) konnten in ihren Untersuchungen zwar nicht klären, in welchem Zusammenhang Diarrhoe-Faktor und Mäuse-Letaltoxin von B. cereus standen, jedoch gelang erstmals der Nachweis eines zweiten Letalfaktors. Während der eine eng verwandt, wenn nicht sogar identisch mit dem Diarrhoe-Faktor war, stand der andere in enger Verbindung mit den Enzymen Cereolysin und Phospholipase.

TURNBULL et al. (1979) untersuchten die Eigenschaften von emetischem und Diarrhoe-Toxin. Der emetische Faktor wies eine Molekülgröße von 5000 auf, war hitzeresistent und wahrscheinlich kein Protein. Die Bildung erfolgte nur auf Reismedium. Nach Auffassung der Autoren waren nur bestimmte Stämme, wahrscheinlich im Zusammenhang mit der Sporulation, zur Bildung dieses Faktors fähig. Das Diarrhoe-Toxin wurde von fast allen der untersuchten 116 B. cereus-Stämme in unterschiedlichem Ausmaß gebildet. Es erwies sich als ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 50 000 und stellte nach Meinung der Autoren den in der Literatur als "fluid accumulation factor", "vascular permeability factor", "dermonecrotic toxin" usw. bezeichneten Faktor dar.

THOMPSON et al. (1984) trennten die extrazellulären Proteine von B. cereus chromatographisch und erhielten mehrere Fraktionen mit unterschiedlichen Eigenschaften. Eine Fraktion mit drei Antigenen war toxisch für Versuchstiere und Zellkulturen. Zwei weitere Fraktionen waren zwar einzeln ohne Wirkung, bewirkten aber in Kombination eine positive Reaktion. Die Autoren schlossen daraus, daß toxische Aktivitäten einem bestimmten Stoff zuzuordnen sind, der in mehreren Fraktionen enthalten sein kann.

Auch KRAMER (1984) konnte bei der isoelektrischen Fokussierung (IEF) von B. cereus-Kulturfiltraten zwei peaks darstellen, die

im Tierversuch jeweils Permeabilitätssteigerung von Gefäßen und Nekrosen hervorriefen.

GILBERT und KRAMER (1984) gaben eine aktuelle Zusammenfassung der Erkenntnisse über die B. cereus-Enterotoxine, in der verfügbare Daten über Art und Wirkungsweise sowie über Nachweismethoden dargestellt wurden (Tab. 2).

2.4.2 Toxinbildung durch andere lebensmittelrelevante Bacillus-Species

Verschiedene Autoren stellten Untersuchungen zum Lecithinase-Bildungsvermögen einzelner Bacillus-Species an. So zeigten neben Vertretern von B. subtilis, B. pumilus und B. licheniformis (BERKEL u. HADLOK,1976) auch B. polymyxa-Stämme Lecithinasebildung (OBI, 1980). BERKEL und HADLOK vermuteten einen möglichen Zusammenhang zwischen Lecithinase- und Toxinbildung.

HELLMANN (1972) untersuchte hitzeabgetötete Bacillus-Kulturen auf ihre Pathogenität für Mäuse. Es zeigte sich, daß B. subtilis und B. licheniformis nach i.p.-Applikation eine letale Wirkung hatten, die sich durch Trypsinbehandlung des Kulturmaterials erheblich steigern ließ. Nach dieser Trypsinbehandlung waren die Keime auch nach oraler Gabe tödlich. Bei serologischen Untersuchungen reagierten in der Komplementbindungsreaktion Stämme der Species B. pumilus, B. lentus und B. megaterium mit Kaninchenimmunserum gegen einen B. licheniformis-Stamm.

Zahlreiche Autoren prüften im Tierversuch, ob neben B. cereus weitere Bacillus-Species das "fluid-inducing/skin-test/necrotic toxin" bilden. Hierbei zeigten nur einige Stämme von B. thuringiensis und B. mycoides eine positive Reaktion (SPIRA u. GOEPFERT, 1972; GLATZ et al., 1974; TURNBULL, 1981). Diese Species sind sehr eng mit B. cereus verwandt und lassen sich nur mit großem Aufwand abgrenzen (HARTUNG, 1985). Vertreter der Species B. megaterium, B. subtilis, B. licheniformis, B. pumilus und B. alvei zeigten im Tierversuch negative Reaktionen (SPIRA u. GOEPFERT, 1972; GLATZ u. GOEPFERT, 1973; TURNBULL, 1981).

Tabelle 2 : Some properties of B. cereus diarrheal and emetic toxins

(GILBERT u. KRAMER, 1984)

	Diarrhoeal toxin	Emetic toxin
Purification Methods	Partial (70-90%) Isoelectric focusing; g.75+HA	Partial (?) $CHCl_2$ extraction+G.15
Nature mol.wts.	Protein/50 000-57 000 (G.100) 43 000-46 000	Small peptide/ < 5000
Isoelectric point (pI)	4.9 - 5.3	-
Stabilities		
Heat	Destroyed 55 °C for 20 min	Stable 126 °C for 90 min
pH	Unstable 4 11	Stable 2 - 11
Enzymes, etc.	Pronase and trypsin sensitive. EDTA, -glucuronidase, alkylation resistant	Pepsin an trypsin resistant
Production		
In foods	Sometimes pre-formed?	Pre-formed
Laboratory media	Complex (e.g. BHIG, CAM)	Rice culture slurry
Optimum temperature	32 - 37 °C	25 - 30 °C
Growth phase	Late exponential	Stationary
Biological activities		
Monkey challenge	Diarrhoea 0.5 - 3.5 h	Emesis 1 - 5 h
Rabbit ileal loop	Positive (approx. 150 µg). Necrotic at higher concentrations	Negative
Skin test (VPR)	As above (approx. 1 µg i.d.)	Negative
Infant mouse	Dies	ND
Mouse lethality	Positive (approx. 30 µg i.v.)	ND
HFS, MRC - 5, Vero BHK, MDCK	Cytotoxic (0.1 - 0.5 µg) Negative	ND
Antigenicity	Positive x). May be multicomponent	Not antigenic
Action	1. Fluid (and Na^+, Cl^-?) absorption reversed 2. Severely necrotic. Mucosal and other tissue damage 3. Adenylate cyclase activity/ cyclic AMP or reduced cell energy in damaged microvilli? 4. Glucose and amino acid malabsorption 5. Altered capillary permeability	Not known
Genetics	Episomal-mediated?	Not known
Laboratory detection	1. Ligated rabbit ileal loop 2. Vascular permeability assay 3. Tissue culture assay 4. Immuno-gel diffusion 5. Aggregate haemagglutination	1. Monkey feeding

x) No major antigenic cross-reactivities with Shigella dysenteriae, Vibrio cholerae, Clostridium perfringens or Escherichia LT enterotoxins. ND, No data
Abbrevations: BHK, baby hamster kidney; CAM, casaminoacids mixture; HA, hydroxylapatite; HFS, human foreskin; MDCK, Madin Darby canine kidney; MRC - 5, human embryonic lung; VPR, vascular permeability reaction.

Die Beziehung zwischen Toxinstruktur und Krankheitsverlauf bei Bacillus-Lebensmittelvergiftungen ist selbst für B. cereus, den wichtigsten Vertreter dieser Gattung, noch immer unklar.

TURNBULL et al. (1979) sahen es aufgrund ihrer Untersuchungen als erwiesen an, daß der in verschiedenen Tierversuchen nachgewiesene toxische Faktor von B. cereus beim Menschen Diarrhoen auslösen kann.
In einer umfangreichen Literaturstudie über B. cereus-Toxine räumte TURNBULL (1981) dann aber ein, daß die vorhandenen Informationen nicht ausreichten, um das "fluid-inducing/skin-test/necrotic toxin" als "Diarrhoisches Enterotoxin" zu bezeichnen. Trotzdem setzte er diese Begriffe in einer Übersichtstabelle miteinander gleich. Diese Gleichstellung wurde von weiteren Autoren übernommen (z. B. GILBERT u. KRAMER, 1984).

Auch THOMPSON et al. (1984) folgerten, daß bisherige Versuche zur Herstellung einer Verbindung zwischen den biologischen Aktivitäten von B. cereus und der Symptomatik einer Lebensmittelvergiftung nicht genug gesichert sind. So konnten sie für einen extrazellulären Faktor von B. cereus, der durch aufwendige chromatographische Verfahren isoliert wurde, dessen Verantwortlichkeit für Diarrhoen nur vermuten.

Zusammenfassend muß daher gesagt werden, daß hinsichtlich der Bedeutung von Bacillus-Toxinen für die Entstehung von Lebensmittelvergiftungen zwar zahlreiche kasuistische Angaben, aber noch nicht genügend toxikologisch gesicherte Erkenntnisse vorliegen. Dies gilt nicht nur für die bisher am besten erforschte Species, B. cereus, sondern auch für die anderen vereinzelt als Lebensmittelvergifter isolierten Bacillus-Species.

2.5 Selektive Erfassung aerober Sporenbildner aus Lebensmitteln

Die Gesamtkeimzahl eines Lebensmittels besitzt im Hinblick auf seinen hygienischen Status nur eine beschränkte Aussagekraft. So gehören lebensmittelhygienisch bedeutsame Mikroorganismen, wie die Erreger von Infektionen und Intoxikationen, meist zu

den geringeren Anteilen der Gesamtflora. Zur gezielten Erfassung dieser Keimgruppen ergibt sich also die unbedingte Notwendigkeit der Anwendung selektiver Medien oder Methoden.

REUTER (1970) nannte bestimmte Beurteilungskriterien für Selektivmedien. Im Gegensatz zur optimalen Selektivität, bei der ausschließlich die gesuchten Mikroorganismen wachsen, sind bei der bedingten Selektivität die mitwachsenden Begleitkeime durch morphologische, biochemische oder physiologische Kriterien abzugrenzen. Eine optimale Anwachsrate entspricht der auf nichtselektiven Medien. Tolerierbar erschien die Reduktion um maximal eine Zehnerpotenz. Die Auswertbarkeit sollte nach möglichst kurzer Bebrütung und ohne Hilfsmittel möglich sein. Das Medium sollte billig und leicht in der Herstellung sein und eine lange Haltbarkeit haben. Bei flüssigen Selektivmedien muß man im Gegensatz zu festen Selektivmedien möglicherweise eine verringerte Anwachsrate zugunsten hoher Selektivität in Kauf nehmen.

MOSSEL (1984) nannte als Schlüsselbegriffe für die Entwicklung und Anwendung selektiver Medien die Produktivität, Selektivität, Elektivität, Anwendbarkeit bei nativen Lebensmittelproben und Taxobias. Die Produktivität eines Selektivmediums muß für die erwünschte Keimgruppe so gut sein, daß die Keimzahl nur maximal $\log_{10} n = 0{,}5$ geringer ist als auf dem Vergleichsmedium ohne Selektivstoffe. Die Selektivität gegen unerwünschte Begleitkeime sollte deren Zahl gegenüber dem Vergleichsmedium um mindestens $\log_{10} n = 5$ reduzieren, d.h. um mindestens 5 Zehnerpotenzstufen. Elektivität ist die leichte Erkennbarkeit von gesuchten Kolonien aufgrund morphologischer oder biochemischer Merkmale auf dem betreffenden Medium. Bei der Anwendung bei nativen Lebensmittelproben ist die Ausbeute an erwünschten Keimen und die Hemmung unerwünschter Mikroorganismen in verschiedenen Verdünnungsstufen von Bedeutung. Als Taxobias wird die Hemmwirkung eines Mediums auf eine bestimmte Species oder einen Biotyp innerhalb der selektiv erfaßten taxonomischen Gruppe bezeichnet.

2.5.1 Selektive Erfassung von Bacillus-Sporen

Der Übergang von der ruhenden Spore zur vegetativen Zelle gliedert sich in drei Phasen: Aktivierung, Germination und Wachstum. Ohne Aktivierung verbleibt die junge Spore selbst in einem optimalen Germinationsmedium in der Ruhephase. Die am besten erforschte und am häufigsten benutzte Form der Aktivierung ist die Einwirkung subletaler Hitze. Daneben haben verschiedene chemische Einflüsse und die Alterung der Sporen einen aktivierenden Effekt (KEYNAN u. EVENCHIK, 1969).
Werden aktivierte Sporen in ein geeignetes Medium gegeben, beginnt der irreversible Vorgang der Germination (SMOOT u. PIERSON, 1982). Sind Sporen durch äußere Reize vorgeschädigt, kann man durch ein optimales Germinationsmedium die Ausbeute keimfähiger Sporen verbessern (BLOCHER u. BUSTA, 1982).

2.5.1.1 Medien und Methoden zur Erfassung von Bacillus-Sporen nach Angaben in der Literatur

MOSSEL et al. (1967) trafen nach der Untersuchung von 350 Lebensmittelproben die Feststellung, daß eine 1-minütige Erhitzung einer Probe auf 80° C praktisch alle nicht versporten Mikroorganismen abtötete und vorhandene Sporen zur Germination anregte. In diesem Zusammenhang sind auch die Ergebnisse von OBIGER (1976) zu beachten, nach denen hitzetolerante Stämme bedeutsamer Infektionserreger nach 20 sec bei 72° C ausnahmslos abgetötet wurden.

WALLEN und WALKER (1979) entwickelten ein Germinationsmedium für B. subtilis-Sporen und stellten fest, daß Hefeextrakt, Glukose, Caseinhydrolysat sowie Mangan- und Eisensulfat einen positiven Einfluß auf die Sporenausbeute hatten.

BLOCHER und BUSTA (1982) stellten aus Literaturangaben Germinationsmedien für Sporenbildner zusammen. Danach sollten verschiedene Zucker, Eigelb und Stärke die Sporenausbeute ebenfalls verbessern. Weiterhin wurden im Labor der Verfasser verschiedene Medien und Methoden zur Erfassung erhitzter B. ce-

reus-Sporen vergleichend geprüft. Hier erwies sich die MPN-Methode in Verbindung mit TSB (Trypticase-Soy-Broth) als optimal. Von den festen Medien schnitt der MYP (Mannitol-Egg yolk-Phenol red-Polymyxin Agar nach MOSSEL et al., 1967) am besten ab. Die Autoren vermuteten, daß ein Faktor im Eigelb den Zustand der Sporen und damit die Ausbeute verbesserte. Der Polymyxingehalt des Mediums hatte keinen negativen Einfluß auf die Resultate.

Eine Arbeitsgruppe an der Universität von Minnesota (JOHNSON et al., 1982; JOHNSON et al., 1983; JOHNSON et al., 1984 u. JOHNSON u. BUSTA, 1984) verwendete als Germinationsmedien MYP, MYP mit 50%-iger Eigelbemulsion sowie TSB. Die Aktivierung der Sporen wurde durch 15-minütige Erhitzung auf 70° C erzielt.

HARTUNG (1985) führte zur Bestimmung des Sporulationsgrades von Bacillus-Kulturen eine 10-minütige Erhitzung auf 85° C durch (nach SPUDICH u. KORNBERG, 1968). Die Kultivierung der Sporen erfolgte auf Agarplatten.

SCHMIDT-LORENZ (1980-1983) faßte in seiner Methodensammlung Verfahren zur Erfassung von Bacillus-Sporen aus Lebensmitteln zusammen. Allen Verfahren ist eine Erhitzung des Probenmaterials zur Abtötung der Begleitflora und zur Hitzeaktivierung der Sporen gemeinsam. Erhitzungsdauer und -temperatur sowie die Medien zur anschließenden Kultivierung und die Dauer der Bebrütung unterscheiden sich je nach Zielkeimgruppe und Methode beträchtlich. Die Erhitzungsdauer liegt zwischen 5 und 30 min, die zu erreichenden Temperaturen bewegen sich zwischen 62,8° und 108° C. Die Bebrütung auf den unterschiedlichsten Medien erfolgt für 20 bis 72 h, wobei sich die Bebrütungstemperatur nach dem Temperaturoptimum der Zielkeimgruppe richtet. Für die Erfassung von B. cereus-Sporen werden eigelbhaltige Nährmedien verwendet und teilweise zusätzliche Bestätigungsreaktionen verlangt.

Angaben über die Quellen der Verfahren, die Art der zu testenden Lebensmittel sowie die Zielkeimgruppen und die Verfahrensweisen gibt die nachfolgende Tabelle 3, die z.T. nach Angaben der Methodensammlung von SCHMIDT-LORENZ zusammengestellt wurde.

Tabelle 3: Verwendete Methoden zur Isolierung von Bacillus - Sporen aus Lebensmitteln

Produktgruppe	Quelle	Zielkeimgruppe	Hitzeaktivierung	Nährmedium	Kultur	Bebrütung	Bestätigungs-reaktionen
Zucker	Ind.	thermophile Bacillus-Sporen	5 min aufkochen od. 20 min Dampftopf	Dextrose-Casein-Pepton-Agar(DCA) +0,04g Bromkresolpurpur	Membranfilter oder Gußplatte	48 h, 55°C	-
	Ind.		10 min,100°C	DCA	Membranfilter (Gußplatte)	48-72 h,55°C	
	Ind.		5 min aufkochen	Glucose-Trypton-Agar (GTA)	Gußplatte	48-72 h, 50-55°C	-
	AOAC		5 min aufkochen	GTA	Gußplatte	35-48 h,55°C	-
Gewürze	APHA	mesophile Bacillus-Sporen	30 min, 80°C	Trypton-Glucose-Extrakt-Agar	Gußplatte	48 h, 35°C	-
Bedarfsgegenstände. Packstoffe	Ind.	mesophile Bacillus-Sporen	20 min, 80°C	Nahragar	Gußplatte	3 d, 30°C	-
Fleischprodukte	APHA	B.cereus-Sporen	15 min, 70°C	MYP, KG	Oberfläche	20-24 h,32°C	Glucose anerob. Nitrat, VP-Reaktion
Feinbackwaren,Creme- u. Puddingpulver	Ind.	thermoph.Bacillus-Sporen m.Säurebildg.	10 min, 108°C	Dextrose-Casein-Pepton-Agar	Gußplatte	48 h, 55°C	-
Aromen	Ind	thermoph. B.-Sporen mesophile B.-Sporen	80°C	Plate-Count-Agar +Triphenyltetrazoliumchlorid	Gußplatte	3-5 d,45°C 3-5 d,32°C	-
Zusatzstoffe	Ind.	mesophile B.-Sporen	30 min, 80°C	Trypton-Glucose-Extrakt-Agar	Gußplatte	48 h, 35°C	-
		mesophile B.-Sporen	15 min,75-80°C	Plate-Count-Agar	Gußplatte	72 h, 33°C	-
		mesophile B.-Sporen	30 min, 62,8°C	Standard-methods-Agar	Gußplatte	48 h, 35°C	-
verschiedene Lebensmittel	Ind.	B.cereus-Sporen	10 min, 80°C	MYP-Agar B.cereus-Agar nach DONOVAN	Gußplatte	24 h, 30°C	-
Fleisch u. Fleisch-produkte	ISO Entwurf 234E, Juli 1974	mesophile B.-Sporen	15 min, 80°C	Nutrient-yeast-extract-Agar	Gußplatte	3 d, 30°C	-
Lebensmittel	ISO Entwurf ISO/DIS 7932	B. cereus-Sporen	15 min, 70°C	MYP-Agar	Oberfläche	18-24 h,30°C	Glucose, Nitrat, VP-Reaktion

Ind = Methoden von Untersuchungslabors der Industrie

AOAC = Official Methods of Analysis of the Association of Official Chemists 13.Aufl., 1980, Washington, USA

APHA = American Public Health Association

ISO = International Organization of Standardization

2.5.2 Medien und Methoden zur Erfassung der Gesamtzahl aerober Sporenbildner nach Angaben in der Literatur

Gibt man eine Lebensmittelprobe unbehandelt auf ein Selektivmedium für aerobe Sporenbildner, ist es möglich, daß alterungsaktivierte Sporen anwachsen und in die ermittelte Keimzahl eingehen. BLOCHER und BUSTA (1982) stellten fest, daß aktivierte B. cereus-Sporen auf MYP gegenüber einem selektivstofffreien Vergleichsmedium kein reduziertes Wachstum zeigten. Man sollte daher bei der Verwendung eines Selektivmediums immer von der Gesamtzahl aerober Sporenbildner, B. cereus usw. sprechen und in diesen Begriff alle vermehrungsfähigen Formen der Zielkeimgruppe einbeziehen.

DONOVAN (1958) entwickelte das erste Selektivmedium für vegetative Zellen und Sporen von B. cereus. Zu einem Basalmedium mit Pepton, Fleischextrakt und Agar gab sie Eigelb zur Ablesung der Lecithinasereaktion. Die Zugabe von Trinatriumcitrat machte das Grundmedium transparenter, so daß die Trübungszone um typische Kolonien besser erkennbar war. Lithiumchlorid sollte die Milchsäurebakterien hemmen, Polymyxin B das Wachstum gramnegativer Keime unterdrücken. Nicht gehemmte, gramnegative schwärmende Mikroorganismen, nach Meinung der Autorin Proteus-Stämme, wurden durch Überschichtung mit Wasseragar zur Bildung umschriebener Kolonien veranlaßt.

NIKODEMUSZ (1962) sah die Notwendigkeit eines Selektivmediums für B. cereus im Zusammenhang mit der Diagnose von Lebensmittelvergiftungen. In den inkriminierten Lebensmitteln trat dieser Keim zwar in so großer Zahl auf, daß eine Diagnose problemlos war, bei der Untersuchung von Stuhlproben der Patienten war B. cereus jedoch aufgrund der zahlreichen Begleitflora schwer nachweisbar. Äthanol und Kochsalz erwiesen sich bei der Unterdrückung der Darmbakterien als brauchbar. Bei einem Anteil von jeweils 4% wurden Enterobakteriazeen bereits deutlich gehemmt, wobei die Hemmwirkung von Kochsalz ausgeprägter war. Bei 8%iger Zugabe der beiden Selektivstoffe wurden nur grampositive Kokken

nicht beeinträchtigt, der Kochsalzanteil wirkte sich jedoch negativ auf die aeroben Sporenbildner aus. Äthanol zeigte in der gleichen Konzentration keine Hemmwirkung auf die aeroben Sporenbildner. Aus diesen Erkenntnissen resultierte ein Selektivmedium aus Nähragar mit einem Zusatz von Eigelb zur Ablesung der Lecithinasereaktion und einem 8%igen Äthanolanteil als selektiver Komponente. Auf diesem Medium konnten mehr B. cereus isoliert werden als auf einem nichtselektiven Medium. Der Autor führte dies auf den Wegfall der antagonistischen Hemmwirkung gramnegativer Keime zurück.

HAENEL et al. (1965) benutzten zur selektiven Erfassung aerober Sporenbildner aus Stuhlproben ein Selektivmedium mit Eigelbanteil und 7,5%igem Kochsalzgehalt. Während das Eigelb zur Identifizierung von B. cereus diente, sollte das Kochsalz das Wachstum unerwünschter Begleitkeime unterdrücken. Die Autoren isolierten aus den Stuhlproben neben B. cereus weitere kochsalztolerante Bacillus-Species wie B. subtilis, B. licheniformis, B. pumilus und B. sphaericus.

MOSSEL et al. (1967) kombinierten bei der Entwicklung eines Selektivmediums für B. cereus (MYP) die Ablesung zweier charakteristischer Eigenschaften dieser Species. Neben der Erfassung der Eigelbreaktion wurde durch Mannitol- und Indikatorzugabe die Erkennung fehlender Mannitolverwertung bei B. cereus ermöglicht. Als Selektivstoff diente Polymyxin B, nachdem Äthanol- und Kochsalzzugabe keine befriedigenden Ergebnisse geliefert hatten. Zur Bestätigung präsumptiver B. cereus-Kolonien empfahlen die Autoren die mikroskopische Untersuchung, Tests auf Acetylmethylcarbinolproduktion (Voges-Proskauer-Reaktion), Stärke- und Gelatinehydrolyse sowie Nitratabbau und Wachstum auf Chloralhydratagar.

REUTER (1968) entwickelte ein Medium zur selektiven Erfassung von Bazillen aus Fleischerzeugnissen. Die Basis hierfür bildeten die Staphylokokkenmedien von SINELL und BAUMGART (1965 u. 1967). Kaliumrhodanid sollte die gramnegativen Keime hemmen, Cycloheximid unterdrückte das Wachstum von Pilzen. Die Erkennung der Lecithinasebildung durch B. cereus wurde durch Ei-

gelbzugabe ermöglicht. Ein Zusatz von Natriumpyruvat verbesserte die Anwachsrate der Bazillen und machte gleichzeitig das vorher trübe Medium klarer, so daß die Lecithinasereaktion besser abzulesen war. Dieses Eigelb-Pyruvat-Medium (EP) sollte im Vergleich mit einem parallel zu führenden Mikrokokkenselektivmedium eine Bestimmung des Bazillenanteils unter Ausschluß des Mikrokokkenanteils und unter besonderer Berücksichtigung von B. cereus ermöglichen.

Daneben führte REUTER (1968 u. 1970) umfangreiche vergleichende Betrachtungen über die Untersuchung von Lebensmitteln mit selektiven Medien durch. Er prüfte zunächst die Brauchbarkeit der Medien nach NIKODEMUSZ und HAENEL sowie MYP und EP. Bei dem Medium nach NIKODEMUSZ war der schnelle Verlust der Selektivität durch Verdunstung des Alkohols zu bemängeln. Auf dem Medium nach HAENEL wurden einige Enterobakteriazeen nicht gehemmt, einige Bacillus-Species zeigten dagegen unterdrücktes Wachstum. Bei MYP erwies sich die Selektivwirkung des Polymyxins als nicht ausreichend. Neben vielen grampositiven Mikroorganismen wuchsen auch vereinzelt Enterobakteriazeen. EP zeigte gute Anwachsraten für Bazillen, die teilweise über den Werten des selektivstofffreien Vergleichsmediums lagen. Für eine gute Ausprägung der Lecithinasereaktion war allerdings eine mindestens 3-tägige Bebrütung notwendig, während die Ablesung auf MYP teilweise schon nach 24 h erfolgen konnte.

Bei weiteren Untersuchungen über Eignung und Mängel ausgewählter Selektivmedien verglich REUTER u.a. auch EP mit MYP. Auf dem durchscheinenden EP war die Eigelbreaktion zwar besser abzulesen, trat aber im Gegensatz zu MYP verzögert oder schwächer auf. Bei MYP machten sich Störungen durch eine starke Begleitflora bemerkbar.

INAL (1971, 1972) führte gezielte Vergleichsuntersuchungen mit B. cereus-Selektivmedien durch. Geprüft wurden die Medien nach DONOVAN, NIKODEMUSZ und MOSSEL et al. (MYP). Als Material dienten Mischkulturen von Begleitkeimen mit B. cereus und künstlich mit B. cereus kontaminierte Lebensmittel. Das Medium nach DONOVAN zeigte gute Hemmwirkung auf Begleitkeime,

sogar auf andere Bacillus-Species, wobei B. cereus kaum beeinträchtigt wurde. Nachteilig war die fehlende Ablesbarkeit der Mannitolverwertung und das Mitwachsen schwärmender Proteus-Stämme, was durch den Verzicht auf die empfohlene Agarüberschichtung ermöglicht wurde.

Das Medium nach NIKODEMUSZ zeigte mäßige Hemmwirkung auf die Begleitflora. Durch die schnelle Verdunstung des Alkohols war das Medium nicht lagerfähig. Bei der nötigen Bebrütungsdauer von drei Tagen konnte es aus dem selben Grund zum Verlust der selektiven Eigenschaften und zu einem Überwuchern der Begleitflora kommen. Aufgrund dieser Ergebnisse hielt INAL dieses Medium für unbrauchbar. Beim MYP wurden zwar die guten Anwachsraten von B. cereus betont, die Nachteile dieses Mediums waren aber den Ergebnissen von REUTER (1968; 1970) ähnlich.

Im Verlauf der Untersuchungen prüfte INAL auch selbst entwickelte Modifikationen der getesteten Medien. Eine Steigerung des Polymyxingenaltes hemmte bei MYP nicht nur die Begleitflora, sondern auch das Wachstum von B. cereus. Eine eigene Modifikation des Mediums nach DONOVAN mit Mannitol- und Phenolrotzusatz ermöglichte eine größere Sicherheit bei der Erkennung von B. cereus. Eisenchlorid sollte die Erfassung H_2S-bildender Proteus-Stämme ermöglichen. Die Senkung des Eigelbgehaltes sollte eine größere Transparenz des Mediums bewirken. Diese eigene Modifikation zeichnete sich in der Anwendung durch gute Erkennbarkeit der Proteus- und B. cereus-Stämme aus.

KIM und GOEPFERT (1971) strebten eine Bestätigung präsumptiver B. cereus-Isolate durch den Nachweis von Sporenantigen an und entwickelten ein Medium, welches die Bildung freier Sporen in kürzester Zeit ermöglichen sollte. Zu diesem Zweck reduzierten sie das Nährstoffangebot durch Minderung des Peptonanteils. Eine Förderung der Sporulation durch Zugabe verschiedener Salze erwies sich als ungünstig, weil dadurch die Lecithinasebildung gehemmt wurde. Die Ablesung der Lecithinasereaktion sollte durch Phenolrot erleichtert werden (KG-Agar).

JINBO et al. (1978) modifizierten das KG-Medium durch Zugabe von Glycin. Der Glycinzusatz sollte das Wachstum von B. cereus fördern, B. subtilis dagegen hemmen.

HOLBROOK und ANDERSON (1980) reduzierten in ihrem Medium ebenfalls den Peptonanteil zur Verbesserung der Sporulation. Gefördert wurde die Sporulation weiterhin durch die Zugabe von Natriumpyruvat, welches gleichzeitig die Ausprägung der Eigelbreaktion verbesserte. Die Sporenmorphologie ging ein in die Bestätigung präsumptiver B. cereus-Isolate mit einer speziellen Färbung, welche auch die für diese Species charakteristischen Lipidgranula sichtbar machte. Als Selektivstoff diente bei dem Medium Polymyxin. Die Verwertung des zugefügten Mannitols wurde durch Bromthymolblau angezeigt (Polymyxin - Pyruvat - Egg yolk - Bromthymol blue - Agar = PEMBA). Die Autoren testeten den von ihnen entwickelten PEMBA im Vergleich mit KG und MYP. Der PEMBA war den anderen Medien hinsichtlich der Ablesung der Eigelbreaktion überlegen. Die Erkennung Mannitol-negativer Stämme bei starker grampositiver Begleitflora war wegen der guten Pufferkapazität des Mediums ungestört.

SZABO et al. (1984) ersetzten das Bromthymolblau im PEMBA durch Bromchresolpurpur und bezeichneten ihre Modifikation infolgedessen als PEMPA. Weiterhin wurde statt Pepton Trypton verwendet und der pH-Wert des Mediums auf 6,9 gesenkt. Mit der Färbung nach HOLBROOK und ANDERSON konnte B. cereus in jedem Fall bereits nach 24 h erkannt werden.

LANCETTE und HARMON (1980) sowie HARMON (1982) verwendeten für ihre Ringversuche zur Isolierung und Differenzierung von B. cereus aus Lebensmitteln den MYP.

MASSON und VANOS (1982) stellten vergleichende Untersuchungen mit B. cereus-Selektivmedien an. PEMBA, MYP und ein Gelose-Medium von MOSSEL wurden einander gegenübergestellt. Die Resultate zeigten, daß PEMBA den anderen Medien überlegen war.

HARMON et al. (1984) prüften parallel MYP, PEMBA und Trypticase-Soy-Polymyxin-Blut-Agar mit 10 B. cereus-Stämmen, die in Lebensmittel eingemischt wurden. In der Keimausbeute zeigten die drei Medien keine deutlichen Unterschiede. Bei PEMBA erwies sich als nachteilig, daß die Alkalisierung des Mediums durch B. cereus häufig schwach bis gar nicht vorhanden war, so

daß die fehlende Mannitolverwertung gesondert vor der Durchführung weiterer Bestätigungsreaktionen geprüft werden mußte. Als weiteren Nachteil von PEMBA werteten die Autoren das großflächige Wachstum der B. cereus-Kolonien. Zusammengewachsene Kolonien erschwerten die Erfassung der Keimzahl teilweise sehr.

PETERZ et al. (1985) prüften vergleichend MYP, PEMBA und Blutagar auf Selektivität und Ausbeute hinsichtlich B. cereus. Die untersuchten Lebensmittel waren rekonstituierte, anschließend bebrütete Trockennahrungsmittel und pasteurisierte Nahrungsmittel, waren also beim Herstellungsprozeß einer Trocknung und/oder Erhitzung unterworfen worden. Die Ausbeute an bestätigten B. cereus-Isolaten zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Medien. Bei Milchprodukten lag allerdings die Rate der anhand morphologischer Kriterien falsch positiv eingeordneten Kolonien mit durchschnittlich 24,4% deutlich über 11,6% bei den trockenen Produkten. Als Vorzüge des Blutagars werteten die Autoren trotz mitwachsender Begleitflora und vermehrtem Testaufwand für Mannitol- und Lecithinasetest die Verfügbarkeit dieses Mediums auch in kleineren Labors.

Die beschriebenen Selektivmedien sind mit ihren Bestandteilen in Tab. 4 aufgeführt.

Bestehende Methodenvorschriften zu Erfassung vegetativer Bazillen und deren Sporen zielen bisher ausschließlich auf B. cereus ab. Diese Species wird aufgrund morphologischer und biochemischer Eigenschaften auf Blutagar oder eigelbhaltigen Selektivmedien erfaßt. Bei Temperaturen zwischen 30 und 37 ^{o}C wird je nach Methode mindestens 18 h lang bebrütet. Bei den meisten Methoden sind mehr oder weniger umfangreiche Bestätigungsreaktionen für präsumptive B. cereus-Isolate vorgeschrieben.
Eine Zusammenfassung verwendeter Methoden gibt die folgende Tabelle (Tab. 5). Die Angaben wurden, mit Ausnahme des ISO-Entwurfes, nach Angaben von SCHMIDT-LORENZ (1980-1983) zusammengestellt.

Tabelle 4 : Nährmedien zur selektiven Erfassung von Bacillus-Species unter besonderer Berücksichtigung von B. cereus nach Angaben verschiedener Autoren in der Literatur.
Auflistung der Bestandteile in g/l

	Autoren / Bestandteile	DONOVAN (1958)	NIKODEMUSZ (1962)	HAENEL et al. (1965)	MOSSEL et al. (1967)	REUTER (1968)	KIM u.GOEPFERT (1971)	INAL (1972)	JINBO et al. (1980)	HOLBROOK u.ANDERSON (1980)	SZABO et al. (1984)
Nährstoffe	Pepton	5,o	1o,o	1o,o	1o,o	1o,o	1,o	5,o	1,o	1,o	-
	Trypton	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,o
	Fleischextrakt	5,o	5,o	-	1,o	5,o	-	5,o	-	-	-
	Hefeextrakt	-	-	2,5	-	-	o,5	-	o,5	-	-
Salze	NaCl	-	3,o	75,o	1o,o	3,o	-	-	4,o	2,o	2,o
	$MgSO_4 \times 7H_2O$	-	-	-	-	-	-	-	-	o,1	o,1
	Na_2HPO_4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	$Na_2HPO_4 \times 12H_2O$	-	2,o	-	-	-	-	-	-	-	-
	NaH_2PO_4	-	-	-	-	2,o	-	-	-	2,5	2,5
	tri-Na-citrat	5,o	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	KH_2PO_4	-	-	-	-	-	-	-	-	o,25	o,25
	K_2HPO_4	-	-	5,o	-	-	-	-	-	-	-
Reaktionskörper	Mannitol	-	-	-	1o,o	-	-	1o,o	-	1o,o	1o,o
	Eisencitrat	-	-	-	-	-	-	1o,o	-	-	-
Selektivstoffe	Kaliumthiocyanat	-	-	-	-	25,o	-	-	-	-	-
	Natriumpyruvat	-	-	-	-	8,o	-	-	-	1o,o	1o,o
	Glycin	-	-	-	-	-	-	-	3,o	-	-
	Cycloheximid o,4%ige Lösung	-	-	-	-	1o ml	-	-	-	-	-
	Polymixin- B -sulfat	o,oo5 (Wellcome)	-	-	o,o1 (Pfizer)	-	o,o1 (Pfizer)	1ooo E	o,o1	o,o1 (Pfizer)	o,o1 (Sigma)
	LiCl	-	-	-	-	-	-	5,o	-	-	-
	Aethylalkohol 96%ig	-	8o ml	-	-	-	-	-	-	-	-
Indikatoren	Phenolrot	-	-	-	o,o25	-	o,o25	o,o25	o,o25	-	-
	Bromkresolpurpur	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Bromthymolblau (H_2O-löslich)	-	-	-	-	-	-	-	-	o,12	o,12
Zusatzstoffe	Agar	15,o	2o,o	15,o	15,o	15,o	18,o	15,o	18,o	18,o	18,o
	Aqua dest	1ooo ml	ad1ooo ml	1ooo ml	9oo ml	9oo ml	9oo ml	1ooo ml	9oo ml	1ooo ml	1ooo ml
	Eigelbemulsion	5 Eigelb	1oo ml konz.	5o ml konz.	1oo ml 2o%ig	1oo ml 5o%ig	1oo ml 2o%ig	3o ml 5o%ig	1oo ml 2o%ig	5o ml 2o%ig	5o ml 2o%ig
	End - pH	7.o	7.6	7.o	7.1	6.8	6.8	7.o	6.8	7.2	6.9

Tabelle 5 : Verwendete Methoden zur Isolierung von Bacillus cereus aus Lebensmitteln

Produktgruppe	Quelle	Medium	Bebrütung	Bestätigungsreaktionen
Obst, Gemüse, Obst- u. Gemüseprodukte	Ind.	B.cereus-Agar nach DONOVAN	k.A.	k.A.
Kakao, Schokolade, Zuckerwaren und Rohmassen	APHA/FDA	MYP oder KG	48 h, 30°C 20-24 h, 30°C	Mikroskop.Untersuchung;Verwertung von Glucose,Sucrose, Glycerol,Salicin,Nitrat.Gelatine,Stärke; Lackmusmilch Voges-Proskauer(VP)-Reaktion
Fischerzeugnisse	Bundesforschungsanstalt für Fischerei	MYP	18-40 h, 32°C	k.A.
Fleisch, Geflügel	Nordisk Metodik Komite	Blut Agar	20 h, 37°C	Eigelbreaktion
Fleischprodukte	APHA	MYP, KG	20-24 h, 32°C	Mikroskop.Untersuchung; Gelatine,Nitrat,Glucose anaerob, VP-Reaktion
Feinbackwaren, Creme- und Puddingpulver	Ind.	Blut Agar	20 h, 37°C	Eigelbreaktion
Fertiggerichte	Ind.	PEMBA Blut Agar	24 h, 37°C 24 h, 37°C	Mikroskop.Untersuchung Bunte Reihe, Lecithinasereaktion
Lebensmittel	ISO-Entwurf 7932	MYP	18-24 h, 30°C	Abbau von Glucose u.Nitrat, Voges-Proskauer(VP)-Reaktion

Ind. = Methoden von Untersuchungslabors der Industrie

APHA/FDA = American Public Health Association/Food and Drug Administration

ISO = International Organization for Standardization

k.A. = keine Angaben

3. Eigene Untersuchungen

3.1 Material

3.1.1 Definierte Kulturen

Reinkulturen

Es wurden Kulturen im Institut befindlicher Bacillus-Stämme und ausgewählter anderer Keimarten der Lebensmittelmikroflora verwendet. Bei den Begleitkeimen wurde der Schwerpunkt durch die Aufgabenstellung auf mesophile und thermotolerante Arten gelegt. Eine Zusammenstellung der verwendeten Stämme findet sich in Tab. 6.

Mischkulturen

Überprüft wurden Mischungen von 24h-Kulturen eines Bacillus-Stammes mit einem bzw. zwei Stämmen der Begleitflora. Hierzu wurden nur solche Begleitkeime verwendet, die auf den Selektivmedien Wachstum zeigten. Das Mengenverhältnis der Flüssigkulturen betrug bei einfachen Mischungen 1:1, bei Mehrfachmischungen 2:1:1 oder 1:1:1. Einen Überblick über die Zusammenstellung der einzelnen Mischkulturen gibt Tab. 7.

3.1.2 Lebensmittelproben

Für die Untersuchungen wurden 148 Proben verschiedener Lebensmittel herangezogen. Es wurden sowohl getrocknete und pasteurisierte Produkte als auch Fleisch und Fleischerzeugnisse verwendet.
Die getrockneten und pasteurisierten Lebensmittel wurden auf ihren Sporengehalt untersucht. Fleisch und Fleischprodukte wurden vorwiegend auf den Gesamtgehalt an aeroben Sporenbildnern, teilweise aber auch zusätzlich auf den Sporengehalt untersucht.

Eine besondere Gruppe innerhalb der Fleischerzeugnisse bildeten 21 Lebensmittelproben mit sensorischen Abweichungen. Diese

Tabelle 6 : Zusammenstellung der eingesetzten Versuchsstämme

I BAZILLEN

B. cereus = 15 Stämme

NCTC 8035+, ATCC 9634+, ATCC 11778, ATCC 12826, HP 1161 Kiel, BGA 1977, 2342/47 Hellmann, Pettenkofer, L 1128/68 LMH, Smith, Pettenkofer/Kundrat, 15 Milch LMH, 4 dH, 6 dH, Heu Claus 1984.

B. subtilis = 28 Stämme

NCTC 3610 (Marburg)+, ATCC 11774+, ATCC 6633, ATCC 23350, BGA alt, BGA 77, Kundrat, 13 Milch, HK (2), HK (4), HK (5), HK (6), HK (8), HK (9) sowie 1538/13, 1381/1, 694/2a, 1790/23, 2098/35, 1663/10, 185/75, 290/79, 1760/19, 1383/2, 173/74, 1012/3a, 2103/37, 2215/38 (alle Hellmann).

B. licheniformis = 15 Stämme

NCTC 1097+, NCTC 2120+, ATCC 10716, HK (1), HK (3), HK (7), Is. Trockenschnitzel Claus sowie 106/1a, 952/4, 952/4a, 1730/18, 231/76a, 2343/50, 2790/59, 2618/56 (alle Hellmann).

B. pumilus = 6 Stämme

NCTC 2595+, NCTC 2596+, NCTC 8241, Kundrat, 2256/44 (Hellmann).

B coagulans = 4 Stämme

NCTC 3991+, NCTC 3992+, ATCC 7050+, 10 Milch.

B. circulans = 4 Stämme

NCTC 5895+, NCTC 7578+, ATCC 4513+, 2779/66 (Hellmann).

B. lentus = 3 Stämme

ATCC 10840+, 1517/7 u. 1498/6 (beide Hellmann).

Fortsetzung Tabelle 6 :

B brevis = 3 Stämme

NCTC 7096^{+}, NCTC 7577^{+}, ATCC 8185.

B. polymyxa = 3 Stämme

NCTC 4747^{+}, NCTC 7575^{+}, ATCC 8523.

B. firmus = 3 Stämme

ATCC 8247, ATCC 14575, ATCC 17060^{+}.

B. macerans = 3 Stämme

ATCC 4743^{+}, ATCC 8244^{+}, NCTC 7588^{+}.

B. stearothermophilus = 2 Stämme

NCTC 10339^{+}, Kiel 77.

B. megaterium = 2 Stämme

ATCC 14581^{+}, NCTC 5635^{+}.

B. laterosporus = 2 Stämme

DSM 25^{+}, NCTC 7579^{+}.

B. alvei = 2 Stämme

ATCC 6344^{+}, NCTC 7583^{+}.

B. sphaericus = 1 Stamm

NCTC 10338^{+}.

B. species (Isolate) = 8 Stämme

D 1301/1 Döll, 1725/68 Hellmann, Mi 70 LMH, 21 Milch, LIS 69, R_1a Mü, R_1b Mü, R_2c Mü.

Die mit $^{+}$ gekennzeichneten Stämme wurden von Dr. M. Hartung (Inst für Mikrobiologie des Fachbereiches Veterinärmedizin) zur Verfügung gestellt.

Fortsetzung Tabelle 6 :

II BEGLEITFLORA

a) Grampositive

Streptokokken = 19 Stämme

Mastitis-Sc. : Sc. agalactiae, Sc. uberis 32494 Kiel

Milch-Sc. : Sc. lactis 42220 Kiel, Sc. thermophilus 551/1

Orale-Sc. : Sc. salivarius 28433, 7781, Sc. viridans 25877, 27154, alle Kiel

Gruppe-D-Sc. : Sc. bovis 27421, Sc. equinus 6126, beide Kiel
Sc. faecalis ATCC 9790, ATCC 8043,
Sc. faecalis ssp. faecalis 11640, Sc. faecalis ssp. zymogenes 11551, Sc. faecium 11652, 11670, 11651, Sc. durans 11639, 11555, alle Kiel

Staphylokokken = 8 Stämme

Staph.aureus ATCC 6538, ATCC 14458, S1 DVG, SG DVG, BGA, Staph. simulans Schleifer, Staph. xylosus Schleifer, Staph. saprophyticus CCM 883

Mikrokken = 17 Stämme

Mc. flavus ATCC 10340, Mc. luteus ATCC 9341, Mc. caseolyticus ATCC 8460, ATCC 9741, CCM 169, LMH, Mc. candidus ATCC 8425, Mc. nishinomiyaensis Schleifer, Mc. sedentarius Schleifer

Isolate : 5 Mc. aus Starterkulturen, 1 Mc. aus Lymphknoten, 1 Mc. aus Schinken

Laktobazillen = 2 Stämme

L. lactis ATCC 8000, L. acidophilus ATCC 19992

Corynebacterium pyogenes

Hefen = 3 Stämme

Debaryomyces kloeckeri, 2 Fleischisolate

Fortsetzung Tabelle 6 :

b) Gramnegative

Oxidasenegative = 4 Stämme

E. coli ATCC 25922, Proteus vulgaris DVG, Hafnia BGA 67/69, Arizona 2239/70 BGA

Oxidasepositive = 6 Stämme

Ps. aeruginosa 669/70 BGA, Ps. fluorescens 667/70 BGA, Aeromonas hydrophila DSM 30014, 1365/81, Acinetobacter anitratus 1521/78 BGA, Moraxella 8 Kulmb.

Tabelle 7: Zusammensetzung der Mischkulturen aus Bacillus- und Begleitstämmen

Mischungsverhältnis 1 : 1	Mischungsverhältnis 2 : 1 : 1	Mischungsverhältnis 1 : 1 : 1
R_1a (München) Staph. aureus	B. circulans Mc. flavus Mc. caseolyticus	B. circulans Mc. flavus Sc. faecalis
B. licheniformis Ps. aeruginosa	B. licheniformis Sc. faecalis Staph. aureus	B. circulans Staph. aureus Sc. faecalis
B. licheniformis Hefe (Isolat)	B. pumilus Staph. simulans Staph. (Schinken)	B. licheniformis Staph. aureus Mc. caseolyticus
R_1b (München) Sc. faecalis	B. coagulans Staph. aureus Staph. simulans	B. licheniformis Mc. flavus Mc. luteus
R_1b (München) Mc. luteus	B. sphaericus Mc. luteus Sc. faecalis	B. pumilus Staph. aureus Staph. simulans
B. cereus Mc. luteus		B. macerans Sc. faecalis Mc. caseolyticus
B. subtilis Deb. kloeckeri		B. megaterium Mc. flavus Mc. caseolyticus

umfaßte sieben Leberwürste, neun Rotwürste und fünf Pökelwaren. Für die abschließende Oberprüfung der als besonders brauchbar befundenen Kulturmedien und -methoden wurden 127 Lebensmittel herangezogen.
Für die Untersuchung auf Bacillus-Sporen wurden 83 Lebensmittel verwendet. Neben 10 Trockennahrungsmitteln wurden 10 Wurstwaren, 10 Proben von Fleisch und sonstigen Fleischerzeugnissen, 13 pasteurisierte Eiprodukte sowie 40 Gewürze geprüft. Die detaillierte Aufstellung der Proben findet sich in den Tabellen 26-28.
Für die Erfassung der Gesamtzahl aerober Sporenbildner und der NaCl- toleranten Species wurden 27 Proben von Brüh- und Kochwürsten, 13 Proben von Fleisch und sonstigen Fleischerzeugnissen und 4 Gewürzproben eingesetzt. Die untersuchten Produkte sind in den Tabellen 23-25 aufgelistet.

3.1.3 Eingesetzte Nähr- und Selektivmedien

Nichtselektive Kulturmedien

Standard II-Agar. Auf Standard II-Agar (Merck, Art.Nr. 7883) wurden die Stämme kultiviert, die bei den Erhebungen über Selektionsmerkmale zum Einsatz kamen. Weiterhin wurde dieses glukosefreie Medium zur Kultivierung der Stämme für den Oxidasetest eingesetzt.

Standard II-Bouillon. Dieses nährstoffarme Medium (Merck, Art. Nr. 7884) wurde für die Kultivierung von Bacillus-Stämmen eingesetzt, wenn eine Sporulierung erwünscht war.

PFHG-Bouillon. In Pepton-Fleischextrakt-Hefeextrakt- Bouillon mit 0,1% Glukose wurden alle Begleitstämme außer den Milchsäurebakterien kultiviert. Die Zusammensetzung dieses Mediums entspricht dem Lebensmittel-Keimzahlagar (Merck, Art.Nr. 10231) ohne Agarzusatz.

MRS-Bouillon. Die Lactobacillus-Bouillon nach DE MAN, ROGOSA und SHARPE (1960) (Merck, Art.Nr. 10661) kam zur Anzüchtung von Milchsäurebakterien zum Einsatz.

Selektivmedien zur Erfassung vegetativer Bacillus-Zellen und Sporen

Bisher gebräuchliche Selektivmedien. Alle geprüften Medien enthielten Eigelb zum Nachweis der Lecithinasebildung. In zwei Rezepturen waren Mannitol und ein Indikator enthalten. Als Selektivstoff diente zumeist Polymyxin. Eine Auflistung der geprüften Medien mit ihren Inhaltsstoffen gibt Tab. 8.

MYP (MOSSEL et al., 1967)
Neben Eigelb und Polymyxin enthält dieses Medium Mannitol und den Indikator Phenolrot.

EP (REUTER, 1968)
Dieses Medium erfaßt neben Bazillen auch Mikrokokken. Außer Eigelb sind Pyruvat zur Verbesserung der Anwachsrate von Bazillen sowie Kaliumthiocyanat und Cycloheximid als Selektivstoffe enthalten.

KG (KIM u. GOEPFERT, 1971)
Besonderer Bestandteil dieses Mediums ist, neben Eigelb und Polymyxin, Phenolrot zur besseren Ablesung der Lecithinasereaktion.

PEMBA (HOLBROOK u. ANDERSON, 1980)
Außer Eigelb, Polymyxin, Mannitol und dem Indikator Bromthymolblau enthält dieses Medium Pyruvat zur Verbesserung der Sporulation.

Eigene Modifikationen bisher gebräuchlicher Selektivmedien.

Modifikationen des EP-Mediums
Bei gleichbleibendem Selektivstoffgehalt bestand die Modifikation in veränderter Nährstoffzusammensetzung und in der Zugabe von Mannitol und Indikator. Die Rezepturen sind in Tab. 9 zusammengefaßt.

Selektivmedien mit unterschiedlichem Polymyxingehalt
Geprüft wurden die Originalmedien und Modifikationen des EP mit 0,01g, 0,05g und 0,1g Polymyxin/l.

Tabelle 8 : Vergleichend geprüfte Medien zur selektiven Erfassung von Bacillus-Species unter besonderer Berücksichtigung von B. cereus.
Auflistung der Bestandteile in g/l nach Angaben der Autoren

		MOSSEL et al. (1967)	REUTER (1968)	KIM & GOEPFERT (1971)	HOLBROOK & ANDERSON (1980)
Nährstoffe	Pepton	10.0	10.0	1.0	1.0
	Fleischextrakt	1,0	5,0	-	-
	Hefeextrakt	-	-	0.5	-
Salze	NaCl	10.0	3.0	-	2.0
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	-	-	-	0.1
	Na_2HPO_4	-	-	-	2.5
	KH_2PO_4	-	-	-	0.25
	NaH_2PO_4	-	2.0	-	-
Reaktionskörper	Mannitol	10.0	-	-	10.0
Selektivstoffe	Kaliumthiocyanat (Rhodanid)	-	25.0	-	-
	Natriumpyruvat	-	8.0	-	10.0
	Cycloheximid (Actidione) 0,4% ige Lösung	-	10 ml	-	-
	Polymixin-B-sulfat	0.01	-	0.01	0.01
Indikatoren	Phenolrot	0.025	-	0.025	-
	Bromthymolblau, wasserlösl.	-	-	-	0.12
Zusatzstoffe	Agar	15.0	15.0	18.0	18.0
	Aqua dest.	900.0	ad 1000 ml	900.0	1000.0
	Eigelbemulsion	100.0, 20%	100.0, 50%	100.0, konz. (Oxoid)	50.0, 20%
	End-pH	7.1	6.8	6.8	7.2

Tabelle 9 : Eigelb - Pyruvat - Medium nach REUTER (1968) und Modifikationen I - III
Auflistung der Bestandteile in g/l

		EP	Modifik. I	Modifik. II	Modifik. III
Nährstoffe	Pepton	10,0	10,0	1,0	1,0
	Fleischextrakt	5,0	1,0	5,0	5,0
	Hefeextrakt	-	-	0,5	-
Salze	NaCl	3,0	10,0	3,0	2,0
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	-	-	-	0,1
	Na_2HPO_4	-	-	-	2,5
	KH_2PO_4	-	-	-	0,25
	NaH_2PO_4	2,0	2,0	2,0	2,0
Reaktionskörper	Mannitol	-	10,0	-	10,0
Selektivstoffe	Kaliumthiocyanat	25,0	25,0	25,0	25,0
	Natriumpyruvat	8,0	8,0	8,0	8,0
	Cycloheximid (Actidione) 0,4% ige Lösung	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
	Polymyxin - B - Sulfat	-	0,01	0,01	0,01
Indikatoren	Phenolrot	-	0,025	0,025	-
	Bromthymolblau	-	-	-	0,12
Zusatzstoffe	Agar	15,0	15,0	18,0	18,0
	Aqua dest.	ad 1000 ml	900,0	900,0	1000,0
	Eigelbemulsion	100,0 50%	100,0 20%	100,0 20%	50,0 20%
	End-pH	6,8	7,1	6,8	7,2

Medien zur Abgrenzung oder Ausschaltung störender grampositiver Kokken

LSD-Agar. Das Laktobazillen- Streptokokken- Differenzierungsmedium nach ELOY und LACROSSE (1976), das zu Differenzierung zwischen Laktobazillen (grampositive Stäbchen) und Streptokokken (grampositive Kokken) benutzt wird (Laktobazillen wachsen in unregelmäßig-rhizoiden Kolonien mit weißem opaken Hof, Streptokokken bilden runde oder ovale Kolonien, deren Zentrum rot gefärbt ist und die einen klaren Hof haben), wurde überprüft, ob es auch zur Abgrenzung zwischen Bazillen (grampositive sporenbildende Stäbchen) und grampositiven Kokken geeignet ist.
Der LSD-Agar wurde mit einem den Bazillen angepaßten pH-Wert von 6,9 eingesetzt.

COBA (Colistin-Oxolinic acid-Blood-Agar). 1984 beschrieb PETTS ein Selektivmedium für Streptokokken, welches Staphylokokken und die meisten gramnegativen Begleitkeime hemmt. THOMPSON (1985) verwendete COBA mit steigendem Oxolinsäureanteil zur Isolierung von Gardnerella vaginalis und stellte dabei eine gute Hemmwirkung auf Staphylokokken fest. Sollten Bazillen auf COBA wachsen, könnte man sie durch die positive Katalasereaktion von den Streptokokken abgrenzen.
Für die qualitative Oberprüfung wurde COBA-5 (mit 5 mg Oxolinsäure/l) verwendet. Die quantitative Oberprüfung fand auf COBA-5 und COBA-10 statt.

Medien mit Cephaloridin und Fusidin. Die Antibiotika Cephaloridin und Fusidin sind wesentliche Bestandteile eines Selektivmediums für Pseudomonaden (CFC-Agar = Cephaloridin-Fusidin-Cetrimid-Agar nach MEAD u. ADAMS, 1977). Nebenbefunde der Routinearbeit im Hause hatten ergeben, daß CFC-Agar eine gute Selektivwirkung auf grampositive Kokken hatte, Bazillen in ihrem Wachstum dagegen oft nicht unterdrückt wurden. Es sollte daher geprüft werden, ob diese Selektiva die Möglichkeit zur Hemmung grampositiver Kokken boten.

Als Basismedium diente EP-Agar mit einem Zusatz von 10 g Mannitol und 0,025 g Phenolrot pro Liter. Zugesetzt wurden 0,05 g und 0,025 g Cephaloridin (Fa. Glaxo Laboratories, Greenford, England) bzw. 0,05 g und 0,025 g Fusidin (Fucidine Solubile, Fa. Thomae, Biberach).

Blutagar für den Test auf saure Phosphatase. Der Nachweis von saurer Phosphatase wird zur Identifizierung bei Staphylokokken (PICKETT u. WELCH, 1985) und Clostridien (SCHALLEHN u. BRANDIS, 1973) eingesetzt. Die durch die Mikroorganismen gebildete Phosphatase spaltet die Phosphatgruppe des im Nachweisreagenz enthaltenen α-Naphtylphosphates ab. Das freie α-Naphtyl verbindet sich mit dem ebenfalls enthaltenen Diazonium-o-Dianisidin zu einem roten Farbstoff, der bei positiver Reaktion die Kolonien violett erscheinen läßt. Nach SCHALLEHN und BRANDIS kann diese Reaktion auf Blutagar problemlos geprüft werden.
Als Kulturmedium zum Phosphatasetest kam Blutagar mit Glukose zum Einsatz (Blutagar-Basis, Oxoid, Art.Nr. CM 55, mit 35 ml Human-Erykonzentrat und 1 g Glukose pro Liter.

Medien mit verschiedenen NaCl-Anteilen. Ein Leitkriterium zur Differenzierung von Bazillen ist die NaCl-Toleranz. Alle potentiellen Toxinbildner der Gattung Bacillus gehören zu den NaCl-toleranten Species.
Zur Unterdrückung verschiedener Begleitkeime wurde NaCl bereits wiederholt verwendet. CHAPMAN (1948) entwickelte ein Selektivmedium für pathogene Staphylokokken, dessen selektive Wirkung auf einem 7,5%igen Kochsalzzusatz beruht. NIKODEMUSZ (1962) und HAENEL et al. (1965) verwendeten ebenfalls NaCl als selektive Komponente.
Die qualitativen Vergleiche erfolgten auf EP, EPM (EP mit 10 g Mannitol und 0,025 g Phenolrot/l) und auf EPM mit 5% und 7% Kochsalz (EPMS).
Für die quantitativen Versuche wurden EP und EPM sowie EPM mit 5% und 7% Kochsalz eingesetzt.
Die Zusammensetzung von EPM und EPMS (mit 7% Kochsalz) findet sich in Tab. 10.

Tabelle 10 : Zusammensetzung von EPM (Eigelb-Pyruvat-Mannitol-Medium) und EPMS (EPM mit 7% NaCl)
Auflistung der Bestandteile in g/l

	EPM	EPMS
Pepton	10,0	10,0
Fleischextrakt	5,0	5,0
NaCl	3,0	70,0
NaH_2PO_4	2,0	2,0
Kaliumthiocyanat (Rhodanid)	25,0	25,0
Natriumpyruvat	8,0	8,0
Cycloheximid (Actidione) 0,4 %ige Lösung	10 ml	10 ml
Mannitol	10,0	10,0
Phenolrot	0,025	0,025
Agar	15,0	15,0
Eigelbemulsion, 50 %ig	100 ml	100 ml

End-pH 6,8

Medien zur Erfassung des Sporengehaltes (Germinationsmedien)

Flüssige Germinationsmedien. Auf die Eignung als flüssiges Germinationsmedium wurde neben MRS- und PFHG-Bouillon auch TSB (Trypticase-Soy-Broth, BBL Kat.Nr 11768) getestet. Die MRS-Bouillon wurde im pH-Wert dem Optimum der Bazillen angepaßt (pH-Wert der Bouillon = 6,8).

Feste Germinationsmedien. Als Basis für vergleichende Untersuchungen diente neben EPM⁻ und MY (Medien ohne Selektivstoffzusatz) das Germinationsmedium (WW) nach WALLEN und WALKER (1979). Dieses Medium enthält als kennzeichnende Bestandteile Glukose, vitaminfreies Caseinhydrolysat sowie Eisen- und Mangansulfat.
EPM⁻ und MY wurden in Anlehnung an WW modifiziert, so daß insgesamt 7 Medien zur Oberprüfung anstanden. Die Zusammensetzung aller Medien und ihrer Inhaltsstoffe findet sich in Tab. 11.

Kontroll- und Vergleichsmedium

PFHG-Agar. Pepton-Fleischextrakt-Hefeextrakt-Agar mit 0,1% Glukose (REUTER, 1968) wurde bei allen quantitativen Versuchsansätzen als Kontroll- und Vergleichsmedium mitgeführt.

3.1.4 Verdünnungslösungen

Zur Herstellung der Probenerstverdünnung sowie für die weiteren Probenverdünnungen wurde die entsprechende Pepton-Natriumchlorid-Lösung nach DIN 10162 verwendet.

3.1.5 Homogenisierungsgerät

Die Homogenisierung der Probenerstverdünnung bei der Untersuchung von Lebensmitteln wurde mit dem Colworth Stomacher 400 durchgeführt.

Tabelle I1

Auflistung der Bestandteile geprüfter fester Germinationsmedien

	EPM⁻ x)	EPM⁻/WW I +)	EPM⁻/WW II +)	MY x)	MY/WW I +)	MY/WW II +)	WW x)
Pepton	10,0	10,0	-	10,0	10,0	-	-
Fleischeextrakt	5,0	5,0	-	1,0	1,0	-	-
Hefeextrakt	-	-	7,5	-	-	7,5	7,5
Caseinhydrolysat	-	-	6,0	-	-	6,0	6,0
Glucose	-	-	-	-	-	-	2,5
Natriumpyruvat	8,0	8,0	8,0	-	-	-	-
NaCl	3,0	3,0	3,0	10,0	10,0	10,0	-
NaH_2PO_4	2,0	2,0	2,0	-	-	-	-
$FeSO_4 \times 7H_2O$	-	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1
$MnSO_4 \times 7H_2O$	-	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1
Mannitol	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	-
Phenolrot	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	-
Aqua dest.	900 ml	900 ml	900 ml	900 ml	900 ml	900 ml	ad 1000 ml
Agar	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
Eigelbemulsion	100 ml 50%ig	100 ml 50%ig	100 ml 50%ig	100 ml 20%ig	100 ml 20%ig	100 ml 20%ig	-
End - pH	6.8	6.8	6.8	7.1	7.1	7.1	6.9

x) Ausgangsmedien: EPM⁻ = Eigelb-Pyruvat-Mannitol-Agar ohne Selektivstoffe (Kaliumthyocyanat u. Cycloheximid)
MY = Mannitol egg-yolk phenol red Agar nach MOSSEL et al. (1966) ohne Selektivstoffe (Polymixin)
WW = Germinationsmedium nach WALLEN u. WALKER (1979)

+) Modifikationen

3.1.6 Wasserbäder

Für die Erhitzung von Kulturen und Probenmaterial wurden thermostatisch geregelte, temperierbare Wasserbäder der Firmen Haake (± 0,05 °C) und Köttermann (± 0,2 °C) benutzt.

3.1.7 Reagenzien und Chemikalien

Oxidasereagenz

Grampositive Kokken weisen eine negative Oxidasereaktion auf. Obwohl aus der Literatur bekannt war, daß innerhalb des Genus Bacillus selbst von Stamm zu Stamm unterschiedliche Oxidasereaktionen zu erwarten waren (COWAN u. STEEL, 1974), sollte dieser einfache Schnelltest auf seine Eignung zur Unterscheidung geprüft werden.
Der Oxidasetest wurde mit stabilisiertem Oxidasereagenz nach DAUBNER und MAYER (1968) durchgeführt.

Phosphatasereagenz

Das α-Naphtylphosphat-haltige Nachweisreagenz wurde nach den Angaben von SCHALLEHN und BRANDIS (1973) hergestellt.

3.2 Methodik

3.2.1 Herstellung der verwendeten definierten Kulturen

Da sich die Verfahrensweisen zur Herstellung der Kulturen von Versuchsansatz zu Versuchsansatz stark unterschieden, werden sie im Zusammenhang mit der Methodik der jeweiligen Testreihe beschrieben.

3.2.2 Bestimmung der Keimzahl

Die Bestimmung der Kz erfolgte bei allen Ansätzen in Anlehnung an die DIN 10161. Die Flüssigkulturen bzw. die Homogenisate der Probenerstverdünnung wurden dekadisch weiterverdünnt. Die Beimpfung der Medien erfolgte nach der "drop-plating"-Methode

(REUTER, 1968). Die Platten wurden, je nach Versuchsansatz, 4- oder 6-fach unterteilt. Im Parallelansatz wurde je 0,05 ml der jeweiligen Verdünnung mit der Pipette auf die entsprechenden Sektoren der Platten aufgetropft und mäanderförmig ausgezogen. Nach der Bebrütung kamen die Sektoren zweier aufeinanderfolgender Verdünnungsstufen zur Auswertung, wobei nur solche Sektoren berücksichtigt wurden, die maximal 150 gut voneinander abgesetzte Kolonien aufwiesen. Die Berechnung der Kz erfolgte mit der nachstehenden Zahlenwertgleichung:

$$\bar{c} = \frac{\Sigma c}{n_1 \times 1 + n_2 \times 0{,}1}$$

Hierin bedeuten:

$\bar{c}$ gewichteter Mittelwert der Koloniezahlen

Σc Summe der Kolonien aller Sektoren, die zur Berechnung herangezogen werden (niedrigste und nächsthöhere auswertbare Verdünnungsstufe)

n_1 Anzahl der Sektoren der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe

n_2 Anzahl der Sektoren der nächsthöheren Verdünnungsstufe

Den endgültigen Wert erhält man nach Berücksichtigung der ausgezählten Verdünnungsstufen.

3.2.3 Vergleichende Untersuchungen mit definierten Rein- und Mischkulturen

Qualitative Prüfung der Selektivität gebräuchlicher Selektivmedien zur Erfassung der Gesamtzahl aerober Sporenbildner und deren Modifikationen

24h-Plattenkulturen von Bazillen und Begleitkeimen wurden im fraktionierten Ösenausstrich (mäanderförmiges Ausstreichen einer Einzelkolonie, mit ausgeglühter Öse erneutes Ausstreichen, wobei das Ende des ersten Impfstriches gekreuzt wurde, Wiederholung mit Kreuzen des zweiten Impfstriches unter Verwendung einer ausgeglühten Öse) auf die zu prüfenden Selektivmedien

überimpft. Nach 48-stündiger Bebrütung bei 30 °C wurden Koloniemenge, -größe und -morphologie bestimmt. Die Ausprägung der Lecithinasereaktion wurde ebenfalls erfaßt.
Zusätzlich wurde eine mögliche Änderung der Selektivität durch Erhöhung der Bebrütungstemperaturen auf 40 °C geprüft.

Die Kulturen wurden im fraktionierten Ösenausstrich auf die Originalmedien und die Modifikationen des EP-Agars in Anlehnung an die übrigen Medien (Polymyxingehalt 0,05 g/l) überimpft.

Quantitative Prüfung ausgewählter Selektivmedien auf Selektivität und Anwachsraten

Reinkulturen. Die Kz von Flüssigkulturen ausgewählter Stämme wurden auf EP und den EP-Modifikationen I bis III parallel bestimmt. Die Untersuchung von Mod. III wurde vorzeitig abgebrochen (Tab. 14).

Mischkulturen. Zunächst wurde der Keimgehalt der verwendeten Reinkulturen und der fertigen Mischkulturen auf PFHG bestimmt. Parallel dazu wurden die Kz der Mischkulturen auch auf den Selektivmedien bestimmt. Bei der Auswertung wurde der Schwerpunkt auf die Koloniemorphologie der vermischten Stämme gelegt.

Versuche zur Abgrenzung mitwachsender grampositiver Kokken von den aeroben Sporenbildnern

Differenzierende Kulturmedien

Prüfung von LSD-Agar. Je eine Einzelkolonie der Vorkultur wurde mittels fraktioniertem Ösenausstrich auf die LSD-Platte aufgetragen. Die Ablesung erfolgte nach 48 h Bebrütung bei 30 °C. Dabei wurden Wachstum und Koloniemorphologie erfaßt.

Prüfung von COBA. Die qualitative Bewertung erfolgte wie beim LSD-Agar. Für die quantitative Oberprüfung wurde die Kz von Bacillus-Flüssigkulturen parallel zu PFHG bestimmt.

Prüfung von Cephaloridin und Fusidin. Es wurde die gleiche Methodik wie beim LSD-Agar angewandt.

Prüfung verschiedener NaCl-Zusätze. Für die qualitative Bewertung wurden Einzelkolonien von 24 h-Kulturen (auf PFHG-Agar) verwendet. Das Wachstum auf den Platten mit unterschiedlichem Kochsalzgehalt wurde nach 24 h bei 30 °C beurteilt.
Die quantitativen Versuche erfolgten ausschließlich mit 24 h-Kulturen von Bacillus-Stämmen.

Biochemische Bestätigungsreaktionen

Oxidasetest. Die Anzüchtung der zu prüfenden Kulturen erfolgte auf Standard II-Agar. Dieses glukosefreie Medium wurde eingesetzt, um eine falsch-negative Oxidasereaktion durch einen zu niedrigen pH-Wert (aufgrund der Säurebildung beim Glukoseabbau) des Mediums auszuschließen (HAVELAAR et al., 1980). Von einer 24 h-Kultur wurde eine Kolonie abgenommen und auf einem mit Oxidasereagenz getränkten Filterpapier verrieben. Trat innerhalb von 2 min eine deutliche Blaufärbung ein, wurde der Test als positiv bewertet. Eine weniger deutliche Farbreaktion wurde als schwach positiv eingestuft.

Phosphatasetest. Die Vorkulturen wurden auf Blutagar ausgestrichen und für 24 h bei 30 °C bebrütet. Anschließend wurde das nach Angaben der Autoren (SCHALLEHN u. BRANDIS, 1973) erwärmte Farbreagenz auf einige Kolonien aufgetropft. Nach 3 min erfolgte die Ablesung eines möglichen Farbumschlages zu Braunviolett.

3.2.4 Erfassung von Bacillus-Sporen

Überprüfung der Thermotoleranz von Bazillen und ausgewählten Begleitkeimen

Flüssigkulturen von Bacillus-Stämmen wurden nach 10-minütiger Heißhaltung im Wasserbad bei 80 °C auf PFHG ausgestrichen.

Nach 48 h bei 30 °C erfolgte eine Wachstumskontrolle. Die Flüssigkulturen der Begleitstämme wurden parallel für 10 min in Wasserbädern gehalten, die auf 60, 65, 70, 75 und 80 °C temperiert waren. Nach Abkühlung auf Zimmertemperatur wurden Kontrollausstriche auf PFHG angelegt.

Oberprüfung von Germinationsmedien

Flüssige Germinationsmedien

Zur Oberprüfung flüssiger Germinationsmedien wurde die Vorkultur zunächst für 10 min im Wasserbad bei 80 °C gehalten. Nach Abkühlung auf Zimmertemperatur wurde je 1 ml des Pasteurisates in 5 ml TSB, PFHG- und MRS-Bouillon gegeben. Nach 24-stündiger Bebrütung bei 30 °C wurde die Kz der Flüssigkultur bestimmt.

Feste Germinationsmedien

Zur Oberprüfung fester Germinationsmedien erfolgte die Erhitzung der Vorkulturen ebenfalls für 10 min bei 80 °C. Danach wurde die Kz pro ml Kultur parallel auf allen sieben Germinationsmedien ermittelt, wobei erste orientierende Zählungen bereits nach 24 h erfolgten.

3.2.5 Erfassung von Bazillen aus Lebensmitteln

Herstellung der Probenhomogenisate

Die Herstellung der Probenhomogenisate erfolgte in Anlehnung an DIN 10162. Die Lebensmittel wurden, je nach Beschaffenheit, bei Bedarf vorzerkleinert. Danach wurde das Material in einen Plastikbeutel eingewogen und mit NaCl-Peptonwasser 1:10 vorverdünnt. Anschließend wurde der Beutelinhalt für eine Minute im Stomacher gewalkt. Die flüssige Phase des Homogenisates wurde dann entweder erhitzt (zur Erfassung der Sporenzahl) oder direkt als Basis einer Verdünnungsreihe zur Keimzahlbestimmung verwendet.

Bestimmung der Gesamtzahl aerober Sporenbildner in Lebensmitteln

Die Weiterverdünnung des Probenhomogenisates sowie die Beimpfung und Bebrütung der Platten erfolgte nach DIN 10161. Der verwendete Plattensatz umfaßte bei der Untersuchung der Lebensmittel mit sensorischen Abweichungen EP und die Mod.I von EP zur Bestimmung der aeroben Sporenbildner sowie PFHG zu Erfassung der aeroben Gesamtkeimzahl nach DIN 10161. Zur Abgrenzung mitwachsender Kokken und von B. cereus standen morphologische Kriterien zur Verfügung (grampositive Kokken = kleine, knopfförmige Kolonien, meist deckfarbig orange bis weiß. B. cereus = große, rauhe Kolonien mit Trübungszone des Mediums, auf Mod.I rosafarben). Die Gehalte an Keimen der jeweiligen Zielgruppe wurden nach der Berechnungsformel aus DIN 10161 berechnet.

Bei der abschließenden Untersuchung von Lebensmitteln mit Hilfe der erarbeiteten Medien und Methoden wurden zur Erfassung der aeroben Sporenbildner EPM und EPMS verwendet.
Der Gehalt einer Probe an B. cereus wurde auf EPM bestimmt, wobei alle großen rosafarbenen Kolonien mit einer Trübungszone im Medium als B. cereus gewertet wurden. Die für diese Species ermittelten Koloniezahlen wurden in die Berechnungsformel nach DIN 10161 eingesetzt und somit der B. cereus-Gehalt der Probe ermittelt.
Die Erfassung der Gesamtzahl der aeroben Sporenbildner und der NaCl-toleranten Bacillus-Species erfolgte mit EPM bzw. EPMS. Bei der Berechnung der entsprechenden Keimzahlen wurde in Anlehnung an DIN 10165 vorgegangen. Zunächst wurde auf beiden Medien die Kz bestimmt, wobei auf EPM nur solche Kolonien berücksichtigt wurden, die einen Durchmesser von mehr als 1 mm hatten. Anschließend wurden aus der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe jeden Mediums 10 Kolonien einer Gramfärbung und mikroskopischen Untersuchung unterzogen, wobei grampositive Stäbchen als Bazillen gewertet wurden. Die Umrechnung des prozentualen Anteils der Stäbchen an der Kz ergab den Gehalt der jeweiligen Zielkeimgruppe pro g Lebensmittel.

Bestimmung des Gehaltes an Bacillus-Sporen in Lebensmitteln

Während höhere Sporengehalte problemlos mit einer Plattenzählmethode zu bestimmen sind, bietet sich zur Erfassung sehr niedriger Sporengehalte die MPN-Schätzung (Most Probable Number) an, die HILDEBRANDT und ARNDT (1982) wegen ihrer hohen Nachweisempfindlichkeit bei Substraten mit niedriger Kontaminationsrate empfahlen.
Diese Methode basiert auf einem multiplen Röhrchentest, bei dem zunächst von einem flüssigen Substrat oder Probenhomogenisat eine Verdünnungsreihe angelegt wird. Bei Anwendung der MPN-Schätzung zur Sporenerfassung ist das pasteurisierte Homogenisat der Probenerstverdünnung als Grundlage der Verdünnungsreihe zu verwenden. Aus jeder Verdünnungsstufe wird eine gleiche Zahl von Röhrchen mit Nährbouillon mit je 1 ml der Probenverdünnung beschickt. Die Kombination von drei, fünf oder zehn Röhrchen mit 9 ml Bouillon (Verdünnungsfaktor 1:10) in drei Verdünnungsstufen ist am gebräuchlichsten. Nach der Bebrütung erfolgt die Angabe des Untersuchungsergebnisses, in diesem Fall die Zahl der bewachsenen Röhrchen pro Verdünnungsstufe, in Form eines Codes. Die Auswertung wurde mit Hilfe einer Tabelle, wie sie beispielsweise von der APHA (American Public Health Association) verwendet wird, durchgeführt. In dieser Tabelle (Tab. 12) kann die wahrscheinliche Keimzahl pro g Probe abgelesen werden.

Bei den Lebensmitteln mit sensorischen Abweichungen wurde die Sporenzahl nach 10-minütiger Heißhaltung der homogenisierten Erstverdünnung im Wasserbad bei 80 °C bestimmt. Hierzu wurde die "drop-plating"-Methode in Verbindung mit MYP-Agar angewendet. Dieses Verfahren diente gleichzeitig als Kontrolle bei der Frage, ob ein Screening-Test Aufschluß über die zu erwartende Sporenzahl geben könnte. Dazu wurden 3 Röhrchen mit je 9 ml TSB mit je 1 ml der pasteurisierten Probenverdünnung beimpft und 24 h bei 30 °C bebrütet. Die Wachstumskontrolle erfolgte mikroskopisch. Es sollte überprüft werden ob ein Wachstum in weniger als drei Röhrchen auf die Notwendigkeit des MPN- Verfahrens hindeutete.

Tabelle 12 : MPN-Index und 95% Konfidenzintervalle für verschiedene Kombinationen positiver Resultate bei Benutzung von jeweils drei Röhrchen pro Verdünnungsstufe (American Public Health Association, 1976)

10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	MPN-Index	95% Konfidenzintervall
0	0	1	3	< o,5 - 9
0	1	0	3	< o,5 - 13
1	0	0	4	< o,5 - 20
1	0	1	7	1 - 21
1	1	0	7	1 - 23
1	1	1	11	3 - 36
1	2	0	11	3 - 36
2	0	0	9	1 - 36
2	0	1	14	3 - 37
2	1	0	15	3 - 44
2	1	1	20	7 - 89
2	2	0	21	4 - 47
2	2	1	28	10 - 150
3	0	0	23	4 - 120
3	0	1	39	7 - 130
3	0	2	64	15 - 380
3	1	0	43	7 - 210
3	1	1	75	14 - 230
3	1	2	120	30 - 380
3	2	0	93	15 - 380
3	2	1	150	30 - 440
3	2	2	210	35 - 470
3	3	0	240	36 - 1300
3	3	1	460	71 - 2400
3	3	2	1100	150 - 4800

Bei der abschließenden Untersuchung von Lebensmitteln mit Hilfe der erarbeiteten Medien und Methoden diente die homogenisierte Probenerstverdünnung nach 10-minütiger Heißhaltung bei 80 °C als Basis für die Verdünnungsreihen.
Bei Anwendung der MPN-Methode wurde bis auf 10^{-3} weiterverdünnt und aus allen drei Verdünnungsstufen je 1 ml in je drei Röhrchen mit 9 ml TSB gegeben. Die Flüssigkulturen wurden für 24 h bei 30 °C bebrütet. Anschließend wurde aus jeder Kultur ein fraktionierter Ösenausstrich auf EPM und EPMS durchgeführt. Nach 48 h bei 30 °C wurde die Zahl der mit der Zielkeimgruppe bewachsenen Röhrchen durch Ablesung des Plattenwachstums ermittelt. Die NaCl-toleranten Bacillus-Species wurden durch ihr Wachstum auf EPMS ermittelt, auf EPM wuchsen alle mesophilen aeroben Sporenbildner.
Trat bei Impfstrichen oder Einzelkolonien auf EPM Alkalisierung und Trübung des Mediums auf, wurde dies als Vorhandensein von B. cereus gewertet.
Die Bestimmung der jeweiligen Sporenzahl pro g Lebensmittel erfolgte mit Hilfe der MPN-Tabelle. Aus jeder erhitzten Probe wurde ein fraktionierter Ösenausstrich auf PFHG zur Kontrolle eventuell mitwachsender Begleitkeime angelegt.

Bei Anwendung der "drop-plating"-Methode wurden die sieben Germinationsmedien (Tab. 11) parallel beimpft. Die Auswertung der Platten fand nach 48-stündiger Bebrütung bei 30 °C statt. Die Sporenzahl wurde dabei nach DIN 10161 ermittelt. Große rosafarbene Kolonien mit einer Trübungszone im Medium wurden als B. cereus gewertet und gesondert in die Zahlenwertgleichung eingesetzt.

Bei allen untersuchten Lebensmitteln wurde parallel zur Ermittlung des Sporengehaltes die aerobe Gesamtkeimzahl nach DIN 10161 bestimmt.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Vergleichende Untersuchungen mit definierten Rein- und Mischkulturen

Qualitative Oberprüfung der Selektivität und Anwachsraten von gebräuchlichen Selektivmedien für aerobe Sporenbildner

Das Wachstum der eingesetzten Bacillus-Stämme war auf allen geprüften Medien sehr gut.
Die Kolonien von B. cereus zeigten auf MYP, KG und besonders auf PEMBA ein sehr großflächiges Wachstum, so daß die Erkennung von Einzelkolonien mitunter schwer bis unmöglich war.
Bei de übrigen getesteten Species traten nur geringfügige Unterschiede in Koloniegröße und -morphologie auf. Eine Ausnahme bildete hier KG, wo einige Stämme reduziertes Wachstum zeigten.

Die Ablesung der Mannitolverwertung war auf MYP problemlos.
Auf PEMBA erschwerte eine intensive Blaufärbung (Alkalisierung) teilweise die Ablesung der Eigelbreaktion.

Eine nennenswerte Hemmung der Begleitflora, die sich vordringlich auf die Gramnegativen erstreckte, wies nur EP auf (Tab. 13).

Qualitative Oberprüfung eigener Modifikationen gebräuchlicher Selektivmedien

Modifikationen des EP-Mediums. Hinsichtlich der Wachstumsfähigkeit der Bazillen und der Begleitkeime entsprachen die Modifikationen dem EP-Medium. Bei der Ablesung der Lecithinasereaktion ergaben sich im wesentlichen nur graduelle Unterschiede der Reaktionsstärke.

Selektivmedien mit unterschiedlichem Polymyxingehalt. Eine Erhöhung des Polymyxingehaltes hatte keinen oder nur einen unwesentlichen Einfluß auf Wachstum und biochemische Reaktionen der eingesetzten Bacillus-Stämme.
Die Begleitflora wurde durch eine erhöhte Dosierung des Anti-

Tabelle 13 :

Hemmwirkung von Bazillus-Selektivmedien auf unerwünschte Begleitflora. Semiquantitative Darstellung der Anwachsraten lebensmittelhygienisch bedeutsamer Stämme nach 24h bei 30°C. Qualitativer Test mit fraktioniertem Ösenausstrich.

Stamm \ Medium nach	REUTER (1968)	MOSSEL et al. (1967)	KIM/GOEPFERT (1971)	HOLBROOK/ ANDERSON (1980)
Escherichia coli	-	+++	+++	+++
Proteus vulgaris	(+)	+++	+++	+++
Arizona	-	-	+	+
Hafnia	-	+++	++	++
Ps. aeruginosa	+++	+++	+++	++
Ps. fluorescens	-	+	+	+
Sc. faecalis	+++	+++	+++	+++
Sc. faecium	+++	+++	+++	+++
Sc. lactis	+++	+++	+++	+++
Sc. agalactiae	+++	+++	+++	+++
Staph. aureus	+++	+++	+++	+++
Mc. luteus	+	+++	+++	+++
Coryneb. pyogenes	(+)	+++	+++	+
Deb. kloeckeri	+	+++	+++	+++
Aerom. hydrophila	-	++	+++	+++
Moraxella sp.	-	-	+++	+++
Ac. anitratus	-	+++	+++	+++

Anwachsrate: +++ sehr gut
++ gut
+ reduziert
(+) stark reduziert
- nicht angewachsen

biotikums nur auf den Originalmedien besser gehemmt, bei den EP-Modifikationen konnte damit keine Verbesserung der Selektivität erzielt werden. Trotzdem war die Unterdrückung der Begleitflora auf den Modifikationen von EP mit 0,01 g/l Polymyxin besser als auf den Originalmedien mit der 10-fachen Antibiotikamenge. Eine Steigerung von 0,05 g/l auf 0,1 g/l Polymyxin erbrachte allgemein keine besseren Resultate.

Änderung der Selektivität durch Modifizierung der Bebrütungstemperatur. Eine Bebrütungstemperatur von 40 °C kam der maximalen Wachstumstemperatur einzelner Bacillus-Species nahe bzw. überstieg sie, wobei reduziertes oder gar fehlendes Wachstum festzustellen war. Innerhalb der Begleitflora wurde bei 40 °C lediglich ein Streptokokkus-Stamm wirkungsvoller gehemmt.

Zusammenfassung der qualitativen Prüfung:

Auf allen Medien zeigten die geprüften Bacillus-Stämme gutes Wachstum. Die Koloniegröße betrug je nach Species 2 bis 20 mm.

Den Anforderungen an ein Selektivmedium zur Unterdrückung von Begleitkeimen entsprach lediglich das EP-Medium. Alle anderen Medien waren eher elektiv, d.h. die gesuchte Keimgruppe wurde fast ausschließlich durch charakteristische Wachstumsmerkmale erkennbar gemacht.

Durch Erhöhung des Polymyxingehaltes und/oder Modifizierung der Medien in Anlehnung an EP konnte eine erhöhte Hemmung unerwünschter Species erzielt werden.

Eine Erhöhung der Bebrütungstemperatur erwies sich wegen der Wachstumsobergrenze einzelner Stämme als nicht empfehlenswert.

Quantitative Prüfung ausgewählter Selektivmedien auf Selektivität und Anwachsraten

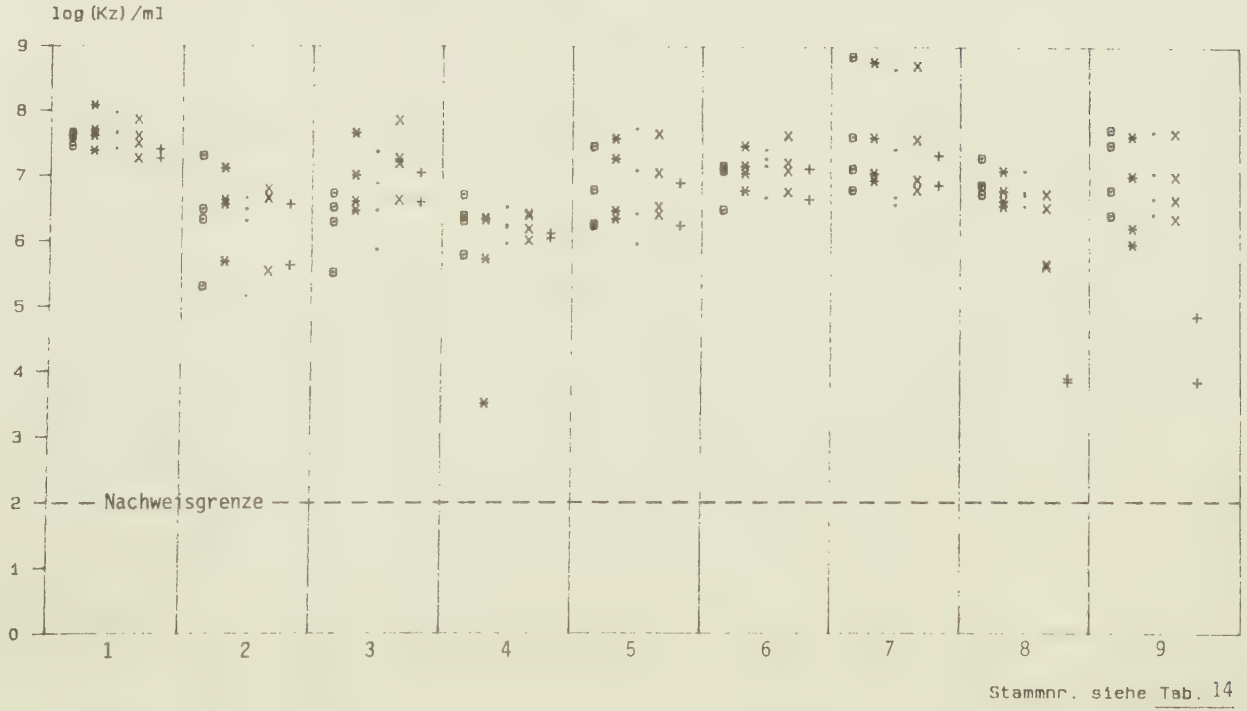
Reinkulturen. Die Ergebnisse der 4-fach-Ansätze mit ausgewählten Bacillus-Stämmen sind aus Tab. 14 und Abb. 1 u. 2 ersichtlic
Auf EP lag der Mittelwert der logarithmierten Keimzahlen nur bei einem geprüften Stamm (B. sphaericus) um mehr als 0.5 unter

Tabelle 14 : Vergleich der Anwachsraten ($\log_{\bar{x}}$/ml) von Bacillus-Stämmen auf PFHG, EP und Mod. I - III (n = 4)

Nr.	Stamm	PFHG		EP		Mod. I		Mod. II		Mod. III o)	
		$\bar{x}_g$	s	$\bar{x}_g$	s	$\bar{x}_g$	s	$\bar{x}_g$	s	$\bar{x}_g$	s
1	B. subtilis	7.58	0.09	7.69	0.29	7.68	0.23	7.56	0.25	7.33	0.10
2	B. subtilis	6.33	0.82	6.49	0.60	6.15	0.68	6.40	0.59	6.02	0.66
3	B. subtilis	6.26	0.53	6.93	0.53	6.64	0.64	6.55	0.49	6.82	0.32
4	B. megaterium	6.29	0.38	6.23	0.33	6.22	0.23	6.24	0.19	6.08	0.05
5	B. megaterium	6.68	0.57	6.91	0.60	6.79	0.77	6.90	0.57	6.56	0.47
6	B. licheniformis	6.96	0.32	7.11	0.29	7.12	0.32	7.16	0.36	6.88	0.33
7	B. pumilus	7.59	0.91	7.58	0.84	7.32	0.96	7.50	0.88	7.09	0.33
8	B. pumilus	6.93	0.24	6.75	0.24	6.77	0.23	6.12	0.58	3.88	0.04
9	B. coagulans	7.10	0.61	6.69	0.76	6.95	0.55	6.91	0.57	4.35	0.71
10	B. coagulans	7.52	0.18	7.39	0.40	6.95	0.46	7.26	0.41	5.25	0.10
11	B. lentus	7.02	0.47	6.88	0.53	6.70	0.63	6.99	0.71	4.42	1.15
12	B. lentus	6.81	0.18	6.81	0.28	6.25	0.36	6.63	0.53	3.77	0.81
13	B. cereus +)	6.97	0.39	6.91	0.31	6.71	0.29	6.83	0.11	-	-
14	B. stearothermophilus	6.91	0.69	6.90	0.52	6.87	0.50	6.94	0.45	7.19	0.38
15	B. circulans	6.98	0.31	6.81	0.42	6.84	0.37	6.78	0.36	4.61	0.81
16	B. brevis	6.89	0.44	6.89	0.33	6.92	0.46	6.92	0.33	6.89	0.27
17	B. sphaericus	7.18	0.85	6.29 +)	0.91	<2.00	-	<2.00	-	<2.00	-
18	B. polymyxa	6.98	0.37	6.95	0.34	6.89	0.29	6.90	0.26	6.68	0.51

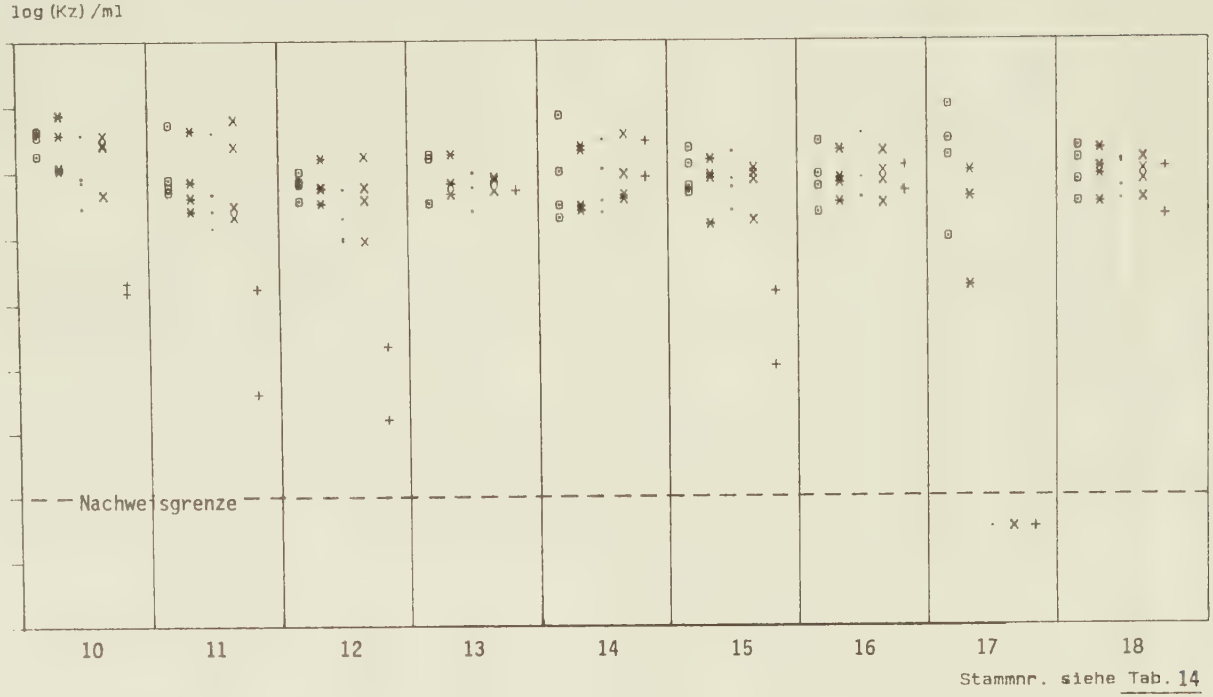
PFHG = Pepton-Fleischextrakt-Hefeextrakt-Agar mit 0,1% Glukose
EP = Eigelb-Pyruvat-Agar nach REUTER (1968)
$\bar{x}$ = Mittelwert der logarithmierten Keimzahlen
s = Standardabweichung
Mod. I - III = Modifikationen von EP (siehe Tab. 9)
o) = n = 2
+) = n = 3

Abb. 1 : Vergleich der Anwachsraten (log/ml) von Bacillus-Staemmen auf PFHG, EP und MOD. I - III



ø - PFHG-Agar
* - EP-Agar
. - Mod. I
x - Mod. II
+ - Mod. III

Abb. 2 : Vergleich der Anwachsraten (log/ml) von Bacillus-Staemmen auf PFHG, EP und MOD. I - III



o - PFHG-Agar
* - EP-Agar
. - Mod. I
x - Mod. II
+ - Mod. III

Tabelle 15:

Anwachsraten und Koloniedurchmesser+) ausgewählter Begleitstämme auf EP-Agar und den Modifikationen I und II im Vergleich zu PFHG (48h,30°C)

Stamm	PFHG	EP	Mod.I	Mod.II
Ps. aeruginosa	8.75 II	-x)	-	-
Mc. luteus	7.65 +	-	-	-
L.lactis	8.85 (+)	-	-	-
Aerom. hydrophila	6.51 III	-	-	-
Deb. kloeckeri	7.68 +	-	-	-
Hefe (Isolat)	7.85 I	-	-	-
Hefe (Isolat)	7.74 I	-	-	-
Sc. faecalis	8.81 I	8.90 +	8.79 +	8.86 +
Sc. faecium	8.61 I	8.72 +	8.76 +	8.75 +
Mc. flavus	8.26 II	8.71 I	8.66 +	8.68 +
Staph. aureus	8.20 I	8.34 +	8.18 +	8.11 +

+)Koloniedurchmesser: (+) = "pin-point"-Kolonien
+ = ca. 0,5 mm
I = 0,5 - 1 mm
II = 1 - 2 mm
III = 2 - 4 mm

x)< 2.00

PFHG = Pepton-Fleischextrakt-Hefeextrakt-Agar mit 0,1% Glucose (REUTER,1968)
EP = Eigelb-Pyruvat-Agar (REUTER,1968)

dem Wert des Vergleichsmediums. Die Differenz lag jedoch deutlich unter einer Zehnerpotenz.

Bei der Mod. I von EP zeigten drei Stämme erniedrigte Anwachsraten, bei denen die Differenz zum Vergleichsmedium im Mittel mehr als 0.5 betrug (B. coagulans, B. lentus, B. sphaericus). Bei B. sphaericus betrug diese Differenz mehrere Zehnerpotenzen.

Auf Mod. II von EP wurde ein Stamm von B. pumilus um 0.81 und B. sphaericus um 5.18 reduziert (die Zahlen geben die Differenz der Mittelwerte zum Mittelwert des Vergleichsmediums an).

Auf der Mod. III wurden sieben Stämme in ihren Anwachsraten gegenüber dem Vergleichsmedium um mehrere Zehnerpotenzen reduziert, so daß nach zwei Durchgängen auf eine weitere Oberprüfung verzichtet wurde.

Von den geprüften Begleitkeimen zeigten nur Entero- und Mikrokokken- sowie Staphylokokken-Stämme Wachstum. Die anderen Mikroorganismen wurden um 4 bis 6 Zehnerpotenzen reduziert, wie aus Tab. 15 ersichtlich ist. Darunter war auch ein Stamm von Mc. luteus.

Mischkulturen. In quantitativer Hinsicht konnten alle mit Reinkulturen gewonnenen Ergebnisse bestätigt werden. Die Bazillen wurden nur gelegentlich unbedeutend gehemmt.
Bei den grampositiven Kokken aus den Gattungen Streptococcus, Micrococcus und Staphylococcus wurden nur vereinzelt Stämme im Wachstum beeinträchtigt. Fast alle zeigten im Vergleich zum Referenzmedium uneingeschränkte Anwachsraten.

Bei der qualitativen Prüfung unterschiedlicher morphologischer Merkmale zeigte sich, daß sich die Bazillen auch in den komplexen Mischkulturen von den Begleitkeimen unterscheiden ließen. Die mitwachsenden grampositiven Kokken waren durch sehr geringe Koloniegröße und/oder durch deckfarbene, knopfförmige glatte Kolonien gut abzugrenzen. Die Bacillus-Kolonien waren entweder groß und rauh oder gläsern durchsichtig, wenn die Kolonien klein waren.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die geprüften Bacillus-Species auf EP und den Modifikationen I und II nahezu ungehemmt wuchsen.

Die erwünschte Hemmwirkung auf die Begleitflora war mit wenigen Ausnahmen ausreichend. Lediglich grampositive Kokken (Mikrokokken, Staphylokokken, Streptokokken), die sich aufgrund ihrer charakteristischen Morphologie auf diesen Medien (kleine, glatte, undurchsichtige Kolonien, teilweise mit weißer bis gelboranger Pigmentierung) gut von Bazillen unterscheiden ließen, zeigten ein Wachstum.

Versuche zur Abgrenzung mitwachsender grampositiver Kokken von den aeroben Sporenbildnern

Differenzierende Kulturmedien

LSD-Agar. Während alle grampositiven Kokken auf LSD-Agar ein sehr gutes Wachstum zeigten, war das Verhalten der Bacillus-Stämme sehr unterschiedlich: sieben Stämme zeigten kein Wachstum, je zwei Stämme wuchsen gut bzw. sehr gut. In einem Fall war das Wachstum stark reduziert.
Die Form der Kolonien war bei den Kokken immer glatt, die Bazillen wuchsen in von Stamm zu Stamm unterschiedlichen Kolonien. Die Farbe der Kolonien war je nach Stamm rosa bis rotlila. Ein gattungstypisches Bild konnte bei den Bazillen nicht festgestellt werden (Tabb. 16+17).

COBA. Bei der qualitativen Oberprüfung zeigten alle verwendeten Bacillus-Stämme Wachstum. Von den grampositiven Kokken wuchsen die beiden Staph. aureus-Stämme nicht. Nur zwei Sc. faecalis-Stämme zeigten gutes Wachstum, bei den Mikrokokken war das Bild uneinheitlich.
Beim Vergleich der Anwachsraten zeigte sich, daß diese bei den Bazillen um mehr als 4 Zehnerpotenzen reduziert waren (Tabb. 16 u. 17).

Medien mit Cephaloridin und Fusidin. Cephaloridinzusatz ermöglichte in beiden verwendeten Konzentrationen keinem der geprüften Stämme ein Wachstum.
Auf EPM mit 0,05 g/l Fusidin wuchsen fünf Bazillen- und drei Kokken-Stämme an. Die Kokken zeigten im Gegensatz zum Vergleichsmedium reduziertes Wachstum und erreichten eine Koloniegröße von maximal 1,5 mm. Das Wachstum der Bazillen war von Stamm zu Stamm unterschiedlich, wobei der Koloniedurchmesser 5 - 12 mm betrug.
Auf EPM mit 0,025 g/l Fusidin zeigten drei zusätzliche Stämme grampositiver Kokken ein Wachstum (Tabb. 16+17).

Medien mit verschiedenen NaCl-Anteilen. Bei der qualitativen Bewertung von EPMS zeigte sich, daß die geprüften Streptokokkenstämme durch den 7%igen NaCl-Anteil völlig gehemmt wurden. Von den 23 Micrococcus- und Staphylococcus-Stämmen wurden 6 im Wachstum unterdrückt. Bei den parallel untersuchten Bacillus-Stämmen zeigten erwartungsgemäß die Vertreter der NaCl-toleranten Species Wachstum auf EPMS. Bemerkenswert war, daß die drei B. cereus-Stämme nicht anwuchsen, die beiden Vertreter von B. coagulans dagegen Wachstum zeigten (Tabb. 16+17).
Beim Vergleich der Anwachsraten ausgewählter Bacillus-Stämme auf PFHG, EP sowie EPM mit 0,3%, 5% und 7% NaCl zeigten die NaCl-toleranten Species nur geringe Verluste auf EPMS. Die Verringerung der Anwachsrate lag zumeist unter einer Zehnerpotenz. Eine Ausnahme bildeten die 3 Stämme von B. cereus, einer als NaCl-tolerant beschriebenen Species, die eine teilweise deutlich reduzierte Anwachsrate zeigten. Zwei Stämme von B. lentus uns ein B. coagulans-Stamm zeigten auf EPMS Anwachsraten, die weniger als eine halbe Zehnerpotenz unter dem Vergleichsmedium lagen (Tab. 18).

Biochemische Bestätigungsreaktionen

Oxidasetest. Von 88 geprüften Bacillus-Stämmen erwiesen sich 20 als oxidasenegativ, 26 als schwach positiv und der Rest als ein-

deutig positiv. Durch eine eindeutig positive Oxidasereaktion wären also nur 42 Stämme von den grampositiven Kokken abzugrenzen gewesen. Somit ist diese Schnellmethode zur Differenzierung zwischen Bazillen und mitwachsenden grampositiven Kokken unbrauchbar (Tab. 19).

Phosphatasetest. Von den grampositiven Kokken zeigten Mc. aurantiacus und die beiden getesteten Staph. aureus-Stämme eine positive Reaktion. Von den Bacillus-Stämmen lieferten zwei B. cereus-Stämme und ein Lebensmittelisolat einen Farbumschlag, der jedoch nicht so ausgeprägt war wie bei den Kokken.
Die Ergebnisse zeigen, daß der Test auf Bildung von Phosphatase zu einer gattungsmäßigen Abgrenzung von Bazillen nicht geeignet ist (Tabb. 16+17).

3.3.2 Erfassung von Bacillus-Sporen

Überprüfung der Thermotoleranz von Bazillen und ausgewählten Begleitkeimen

Die geprüften Bacillus-Stämme zeigten nach der Heißhaltung bei 80 °C für 10 min ausnahmslos Wachstum.
Die Begleitkeime überlebten alle eine Heißhaltung bei 65 °C. Bei 70 °C wurden die beiden Lactobacillus-Stämme abgetötet. Erst bei einer Erhitung auf 75 °C zeigte keiner der geprüften Begleitstämme ein Wachstum.
Die Ergebnisse für die Begleitstämme sind in Tab. 20 zusammengefaßt.

Überprüfung von Germinationsmedien

Flüssige Germinationsmedien

Bei der überwiegenden Anzahl der geprüften Stämme konnten mit TSB die besten Ergebnisse erzielt werden. Hier lag die Keimausbeute teilweise um mehr als eine Zehnerpotenz höher als bei den beiden anderen Medien. PFHG-Bouillon erbrachte die geringsten Germinationsraten.

Tab. 16: Wachstum und andere Kriterien grampositiver Kokken

Stamm	Bezeichnung	LSD	EPM_c	EPM_f	PH	COBA	EPMS
Mc. flavus	ATCC 1o3 4o	.	.	.	.	.	-
Mc. luteus	ATCC 9741	.	.	.	.	+	+
Mc. luteus	ATCC 9341	.	.	.	.	+	+
Mc. luteus	CCM 169	.	.	.	.	.	+
Mc. luteus	LMH	.	.	.	.	.	-
Mc. candidus	ATCC 8425	.	.	.	.	.	-
Mc. nishinomigaensis	Schleifer	.	.	.	.	.	-
Mc. sedentarius	Schleifer	.	.	.	.	.	-
Mc. Isolat		+	-	-	-	+	+
Mc. "		+	-	-	-	+	+
Mc. "		+	-	-	-	+	+
Mc. "		+	-	-	+	+	+
Mc. "		+	-	+	.	.	+
Mc. "		+	-	-	.	.	+
Mc. "		+	-	-/+	.	.	+
Mc. "		+	-	-	.	.	+
Staph. aureus	ATCC 6538	.	.	.	.	.	-
Staph. aureus	S1 DVG	+	-	-/+	+	-	+
Staph. aureus	SG DVG	+	-	-	+	-	+
Staph. aureus	BGA	+	-	-	.	.	+
Staph. simulans	Schleifer	+	-	-/+	.	.	+
Staph. xylosus	Schleifer	+	-	+	.	.	+
Staph. saprophyticus	CCM 883	+	-	+	.	.	+
Sc. uberis	ATCC 32494	.	.	.	.	.	-
Sc. salivarius	ATCC 28433	.	.	.	.	.	-
Sc. salivarius	ATCC 7727	.	.	.	.	.	-
Sc. viridans	ATCC 25877	.	.	.	.	.	-
Sc. viridans	ATCC 27154	.	.	.	.	.	-
Sc. bovis	ATCC 27421	.	.	.	.	.	-
Sc. equinus	ATCC 6126	.	.	.	.	.	-
Sc. faecalis	ATCC 979o	.	.	.	.	.	-
Sc. faecalis	ATCC 8o43	.	.	.	.	.	-
Sc. faecalis ssp. faecalis	ATCC 1164o	.	.	.	.	.	-
Sc. faecalis ssp. zymogenes	ATCC 11551	.	.	.	.	.	-
Sc. faecium	ATCC 1167o	.	.	.	.	.	-
Sc. faecium	ATCC 11651	.	.	.	.	.	-
Sc. durans	ATCC 11639	.	.	.	+	.	-
Sc. durans	ATCC 11555	.	.	.	+	.	-

LSD = Wachstum auf LSD-Agar

$EPM_{c/f}$ = Wachstum auf EPM mit Cephaloridin/Fusidin

Ph = Phosphatasetest

COBA = Wachstum auf COBA

EPMS = Wachstum auf EPM + 7% NaCl

. = nicht getestet

+ = Wachstum

- = kein Wachstum

-/+= Wachstum bei o,o25g/l Fusidin

Tab. 17: Kriterien geprüfter Bacillus-Stämme in durchgeführten Tests

Stamm	Bezeichnung	LSD	EPM_c	EPM_f	Ph	$COBA_{ö}$	$COBA_{d}$	EPMS
B. cereus	ATCC 117 78	.	.	.	.	.	.	-
	ATCC 128 26	.	.	.	.	.	.	-
	ATCC 9634	.	.	.	(+)	+	=	-
	ATCC 1o7 o2	.	.	.	(+)	+	.	.
B. subtilis	ATCC 6633	+	-	+	-	+	.	+
	ATCC 6o51	-	-	-	-	+	=	+
	ATCC 117 74	+	-	+	.	.	.	+
B. licheniformis	ATCC 1o7 16	-	-	+	.	.	.	.
	NCTC 212o	+	-	+	-	+	=	+
	NCTC 1o97	+	-	+	.	.	.	+
	Dr.Claus 1984	-	-	-	-	+	.	.
B. pumilus	ATCC 148 84	.	.	.	-	+	.	.
	Hellm.2256/44	-	-	-	.	.	.	.
	Hellm.2244/42	-	-	-	.	.	.	.
	NCTC 2595	+	-	-	-	+	=	+
	NCTC 2596	-	-	-	-	+	.	+
B. lentus	Hellm.1517/7	.	.	.	-	+	=	+
	Hellm.1498/6	.	.	.	-	+	.	+
	ATCC 1o8 4o	.	.	.	.	.	.	-
B. circulans	Hellm.2779/66	.	.	.	-	+	.	.
	NCTC 5895	.	.	.	-	+	=	-
	ATCC 4513	.	.	.	-	+	.	.
B. brevis	ATCC 8185	.	.	.	-	+	.	.
B. polymyxa	NCTC 7575	.	.	.	-	+	.	.
B. coagulans	NCTC 3992	.	.	.	-	+	=	+
	ATCC 7o5o	.	.	.	.	.	.	+
B. megaterium	NCTC 5635	.	.	.	.	.	.	-
B. sphaericus	ATCC 145 77	.	.	.	.	.	.	-
B. firmus	ATCC 145 75	.	.	.	.	.	.	-
	ATCC 8247	.	.	.	.	.	.	-
B. species	R_1a Mü	.	.	.	-	+	.	+
	R_2c Mü	.	.	.	.	.	.	+
Lebensmittelisolat LIS 69		.	.	.	(+)	+	.	.

LSD = Wachstum auf LSD-Agar
$EPM^{c/f}$ = Wachstum auf EPM mit c=Cephaloridin/f=Fusidin
PH = Phosphatasetest
$COBA_{ö}$ = Wachstum auf COBA-5 nach Ösenausstrich
$COBA_{d}^{ö}$ = Anwachsrate ermittelt mit der Drop-plating Methode
$EPMS^{d}$ = Wachstum auf EPM mit 7% NaCl

. = nicht getestet
+ = Wachstum
- = kein Wachstum
(+) = schwaches Wachstum
= = Anwachsrate gegenüber Vergleichsmedium um mehr als 4 Zehnerpotenzen reduziert

Tab. 18: Wachstum ausgewählter Bacillus-Stämme auf EP, EPM und EPM mit 5% und 7% NaCl im Vergleich zu PFHG

Stamm		EP	EPM	EPM 5%	EPM 7%
B. cereus	ATCC 11778	++	++	-	-
B. cereus	ATCC 12826	++	++	-	-
B. cereus	ATCC 9634	++	++	+	+
B. subtilis	ATCC 6633	++	++	++	+
B. subtilis	ATCC 6051	++	++	++	++
B. licheniformis	NCTC 2120	++	++	++	++
B. licheniformis	NCTC 1097	++	++	++	++
B. pumilus	NCTC 2595	++	++	++	++
B. pumilus	NCTC 2596	++	++	++	++
B. lentus	1517/7 He	++	++	++	++
B. lentus	1498/6 He	++	++	++	++
B. lentus	ATCC 10840	++	++	-	-
B. circulans	NCTC 5895	++	++	-	-
B. coagulans	NCTC 3992	++	++	+	-
B. coagulans	ATCC 7050	++	++	++	++
B. megaterium	NCTC 5635	-	-	-	-
B. sphaericus	NCTC 10338	+	+	-	-
B. firmus	ATCC 14575	++	++	++	-
B. firmus	ATCC 8247	-	-	-	-
B. species	R_1a Mü	++	++	++	++
B. species	R_2c Mü	++	++	++	-

Reduktion der Anwachsrate ($\log_x$) gegenüber PFHG-Agar:

++ = maximal 0.5

\+ = maximal 1.0

\- = über 1.0

Tabelle 19: Oxidase-Reaktion verschiedener Bacillus-Stämme auf Standard-II Agar

Stamm			Stamm		
B. cereus	ATCC 117 78	-	B. licheniformis	ATCC 1o7 16	(+)
	ATCC 128 26	(+)		HK 1	(+)
	HP 1161 Kiel	-		HK 3	(+)
	BGA 1977	-		HK 7	(+)
	2342/47 Hellmann	+		D 1o6/1a Hellm.	+
	Pettenkofer	-		952/4a Hellm.	+
	L 1128/68 LMH	+		952/4 Hellm.	-
	Smith	+		173o/18 Hellm.	(+)
	Pettenkofer/Kundrat	+		231/76a Hellm.	+
	15 Milch LMH	+		2343/5o Hellm.	+
	6 d H	+		279o/59 Hellm.	(+)
	4 d H	+		2618/56 Hellm.	(+)
	ATCC 9634	+		NCTC 212o	+
	ATCC 1o7 o2	+		NCTC 1o97	+
B. subtilis	ATCC 6633	+	B. pumilus	ATCC 148 84	+
	BGA alt	+		2256/44 Hellm.	-
	BGA 77	+		2244/42 Hellm.	(+)
	Pettenkofer Inst.	+		Pettenkofer Inst	(+)
	13 Milch	-		NCTC 2595	+
	ATCC 6o51	-		NCTC 2596	+
	1538/13 Hellmann	+	B. coagulans	ATCC 7o5o	(+)
	1381/1 Hellmann	-		1o Milch	(+)
	694/2a Hellmann	+		NCTC 3992	(+)
	179o/23 Hellmann	+		NCTC 3931	(+)
	2o98/35 Hellmann	+	B. lentus	1517/7 Hellm.	(+)
	1663/1o Hellmann	+		1498/6 Hellm.	(+)
	185/75 Hellmann	+	B. stearotherm.	Kiel 1977	+
	29o/79 Hellmann	-	B. brevis	ATCC 8185	(+)
	176o/19 Hellmann	-		NCTC 7577	+
	1383/2 Hellmann	+	B. sphaericus	ATCC 145 77	+
	173/74 Hellmann	(+)	B. polymyxa	ATCC 8523	-
	1o12/3a Hellmann	+	B. circulans	NCTC 5895	+
	21o3/37 Hellmann	(+)		NCTC 7578	+
	2215/38 Hellmann	+		ATCC 4513	+
	HK (2)	(+)		2779/66 Hellm.	+
	HK (4)	+	B. laterosporus	NCTC 7579	-
	HK (5)	-		ATCC 64	+
	HK (6)	-	B. macerans	ATCC 8244	+
	HK (8)	(+)	B. Isolat	D 13o1/1 Döll	(+)
	HK (9)	+	B. Isolat	1725/68 Hellm.	(+)
	ATCC 117 74	+			
	ATCC 233 5o	(+)			
B. megaterium	Milch 22	+			
	2217/14 Hellmann	+			
	188o/2-27 Hellmann	(+)			
	ATCC 145 81	-			
	NCTC 5635	-			
	ATCC 145 81 I	+			

+ = positiv (+) = schwach positiv - = negativ

Tabelle 20: Wachstum ausgewählter Begleitkeime auf PFHG-Agar nach 10-minütiger Heißhaltung

Stamm \ Temperatur	60°C	65°C	70°C	75°C	80°C
Sc. agalactiae	+	+	+	-	-
Sc. faecalis	+	+	+	-	-
Sc. faecium	+	+	+	-	-
Sc. thermophilus	+	+	+	-	-
Staph. aureus	+	+	+	-	-
L. acidophilus	+	+	-	-	-
L. lactis	+	+	-	-	-
Mc. luteus	+	+	+	-	-
Mc. flavus	+	+	+	-	-
Deb. kloeckeri	+	+	+	-	-

+ = Wachstum
- = kein Wachstum

Feste Germinationsmedien

Obwohl das Medium nach WALLEN und WALKER (WW) kein Eigelb enthält und ursprünglich für die Erfassung H_2O_2-geschädigter Bacillus-Sporen konzipiert wurde, waren die Ergebnisse mit diesem Medium bis auf eine Ausnahme (B. subtilis, ATCC 6633) den Ergebnissen der anderen Medien zumindest gleichwertig (Tab. 21). Auf EPM⁻ und dessen Modifikationen war die Ausbeute an ausgewachsenen Sporen oft unterdurchschnittlich. Bei sechs Stämmen lag das erzielte Mittel der Keimzahlen um zwei und mehr Zehnerpotenzen unter dem Mittelwert des produktivsten Mediums.
Krasse Unterschiede zwischen den Ausgangsmedien EPM⁻ und MY und ihren jeweiligen Modifikationen waren bis auf eine Ausnahme (B. megaterium) nicht zu beobachten. Bei den Stämmen dieser Species war auffällig, daß Wachstum nur auf den beiden Modifikationen von MY auftrat, die Eisen- und Mangansulfat enthielten. Die Eigelbreaktion der B. cereus-Stämme war in allen Ansätzen nach 48-stündiger Bebrütung problemlos abzulesen.

3.3.3 Erfassung von Bazillen aus Lebensmitteln

Lebensmittel mit sensorischen Abweichungen

Die gewonnenen Ergebnisse sind in Tab. 22 dargestellt. Die aerobe Gesamtkeimzahl lag zwischen 4.30 und 8.76 ($\log_x$), wobei an der Oberfläche stets eine höhere Keimbelastung festzustellen war als in der Tiefe. Eine Beziehung zwischen Geruchsabweichung und Keimzahl war nicht offensichtlich.

Die Sporengehalte lagen zwischen < 2.00 und 4.18. Eine höhere Belastung des Oberflächenbereiches im Vergleich zur Tiefe war im Gegensatz zur aeroben Gesamtkeimzahl nicht festzustellen.
Ein Vergleich zwischen ermittelter Sporenzahl und der Zahl der bewachsenen Röhrchen zeigte, daß das Röhrchenwachstum keine Hilfe bei der Wahl der Sporenerfassungsmethode darstellte.

Bei der Auswertung der Selektivplatten zur Erfassung des Gesamtgehaltes an aeroben Sporenbildnern zeigte sich, daß die mit definierten Kulturen erzielten Ergebnisse nicht auf native Lebens-

Tabelle 21: Vergleich verschiedener Germinationsmedien mit Bacillus-Reinkulturen (n = 4)
Mittelwert der logarithmierten Keimzahlen/ml

		WW	EPM⁻	EPM⁻/WW I	EPM⁻/WW II	MY	MY/WW I	MY/WW II
B. subtilis	ATCC 6633	2.48	5.30	5.14	5.05	5.43	5.38	5.35
	ATCC 6051	6.72	6.41	6.53	6.58 (3	6.77	6.73	6.50
B. circulans	NCTC 5895	6.14 (3	4.88 (3	4.31	4.63 (3	6.21 (2	6.08 (3	4.63 (3
	ATCC 4513	6.28	< 1	< 1	< 1	5.34	5.13	3.42
B. brevis	ATCC 8185	7.10	6.71 (3	3.37 (3	6.63 (3	6.79 (3	6.90 (3	6.82 (3
	NCTC 7577	3.25	2.91	3.09	3.05	3.43	3.42	3.22
B. pumilus	NCTC 2595	3.65	3.23	3.51	3.41	3.40	3.39 (3	3.66
	NCTC 2596	4.82	4.80	4.81	4.82	4.83	4.89	4.78
B. cereus	ATCC 9634	5.51 (3	5.35 (3	5.45 (3	5.14	5.51 (3	5.48 (3	5.50 (3
	NCTC 8035	6.21	6.20	6.29	5.97	6.04	6.21	6.08
B. megaterium	ATCC 14581	5.04	<1	<1	<1	<1	4.11 (3	4.13 (3
	NCTC 5635	> 4	<1	<1	<1	<1	5.17 (3	1.48 (1
B. licheniformis	ATCC 10716	5.87	3.88	4.47	3.70 (3	5.59	5.62	5.70
	Isolat	> 4	5.81 (3	5.89 (3	6.07 (3	5.95 (3	5.90 (3	5.92 (3
B. firmus	ATCC 14575	6.99 (3	6.83(3	6.91 (3	6.70 (3	7.00 (3	6.91 (3	6.79 (3
	ATCC 8247	2.25	<1	<1	<1	<1	<1	<1
B. coagulans	ATCC 7050	7.11	6.53	6.51	6.25	6.87	7.09	7.06
B. lentus	ATCC 10840	4.12	<3.78	<4.00	<1	3.97	4.40 (3	4.21 (3
B. sphaericus	ATCC 14577	6.36	6.33	6.49	6.73	6.30	6.34	6.23

(3 = n=3 (2 = n=2 (1 = n=1

Tabelle 22 : Aerober Gesamtkeimgehalt und Bacillus-Sporenzahl von 21 sensorisch abweichenden Fleischwaren ($\log_x$/g)

Art des Lebensmittels	SA	aerobe GKZ O	aerobe GKZ T	Röhrchentest O	Röhrchentest T	Sporengehalt O	Sporengehalt T
Rotwurst	+	7.54	4.49	+++	+++	2.60	3.64
"	+	6.26	4.59	+++	+++	2.00	2.00
"	(+)	5.30	2.00	+++	+++	3.86	3.89
"	÷	6.54	5.68	.	+++	2.65	2.00
"	÷	8.46	7.53	+++	+++	2.91	2.86
"	(+)	7.30	4.59	++-	.	2.60	3.20
"	+	7.40	6.89	+++	+++	3.73	3.08
"	+	8.08	7.89	+++	+++	< 2.00	< 2.00
"	+	7.69	6.11	+++	+++	2.00	2.85
Knappwurst	+	7.75	7.86	+++	+++	4.00	3.99
Kochschinken	+	4.99		---		< 2.00	
Kochschinken	(+)	7.04	6.91	++-	---	< 2.00	< 2.00
Kochschinken	+	4.45	4.30	---	---	< 2.00	< 2.00
Schinken in Aspik	+	7.28	7.20	++-	+++	< 2.00	< 2.00
Kassler, gegart	+	7.46	7.34	---		< 2.00	
Kalbsleberwurst	+	6.20		+++		2.78	
Leberwurst, grob	+	6.93		+++		< 2.00	
Leberwurst, fein	+	4.66		+++		2.85	
Zwiebelleberwurst	(+)	6.59		+++		4.18	
Kalbsleberwurst	+	5.90		+++		2.46	
Leberwurst, fein	+	8.76		+++		2.00	

SA = sensorische Abweichungen
+ = ausgeprägt
(+) = mäßig
÷ = kaum wahrnehmbar

GKZ = Gesamtkeimzahl nach DIN 10161
O = Oberfläche
T = Tiefe

Röhrchentest = Wachstum in 3 mit pasteurisiertem Probenhomogenisat beimpften Röhrchen (siehe 3.2.5)

+ = Wachstum
- = kein Wachstum
. = nicht getestet

mittelproben übertragbar waren. Große rauhe Kolonien waren zwar nach wie vor als Bazillen abzugrenzen, und auch einige Micrococcaceae waren durch weiße, gelbe oder orangefarbene Kolonien gut als solche zu erkennen, ein großer Teil der Kolonien war aber nicht eindeutig zuzuordnen. Nach stichprobenweiser Gramfärbung zeigte sich, daß glatte deckfarbene Kolonien auch von Bazillen gebildet wurden und grampositive Kokken auch in größeren durchscheinenden Kolonien auftraten.

Es ergab sich die Notwendigkeit, das bei Reinkulturen bewährte Modifikationskonzept erneut umzustellen, um die Einsatzfähigkeit für natives Probenmaterial zu gewährleisten.
So bedurften die Selektivmedien einer Verbesserung hinsichtlich der Abgrenzung von grampositiven Kokken. Auch der Aspekt einer weitergehenden Differenzierung der Bazillen auf den Selektivmedien war zu berücksichtigen.
Die Untersuchung von Nativproben wurde aufgrund dieser Ergebnisse zunächst unterbrochen.

Bestimmung der Gesamtzahl aerober Sporenbildner in Lebensmitteln

Gewürze

Der aerobe Gesamtkeimgehalt ($\log_x$) lag zwischen 3.61 und 6.55 je Gramm Probe. Die Zahl der koloniebildenden Einheiten auf EPM lag zwischen 3.34 und 6.32, wobei fast alle Kolonien durch aerobe Sporenbildner gebildet wurden. Die Zahl der Kolonien auf EPMS betrug zwischen 3.23 und 5.56 /g. Hier waren alle Kolonien aerobe Sporenbildner.
Die Einzelergebnisse sind in Tab. 23 aufgelistet.

Wurstproben aus dem Handel

Die aerobe Gesamtkeimzahl der untersuchten Proben schwankte zwischen $\log_x$ = <2.00 und 8.08. Bei acht Proben wuchsen auf EPM neben Kolonien mit bekannter Morphologie auch nadelstichgroße Kolonien, die von katalasenegativen, grampositiven Stäbchen (Milchsäurebakterien) gebildet wurden. Sie waren aufgrund

Tabelle 23 : Nachweis aerober Sporenbildner in Gewürzen mit der "drop-plating"-Methode ($\log_x/g$)

Lfd. Nr.	Bezeichnung	aerobe GKZ	EPM		EPMS	
			Kz	Baz	Kz	Baz
1	Pfefferminze, getrocknet	6.55	6.00	5.62	5.34	5.34
2	Paprika	4.16	4.80	4.80	4.08	4.08
3	Chinagewürz	6.93	6.32	6.18	5.56	5.56
4	Macisblüte	3.61	3.34	3.34	3.23	3.23

GKZ = Gesamtkeimzahl nach DIN 10161
Kz = Koloniezahl
EPM = EP-Agar (REUTER, 1968) mit Mannitol und Phenolrot
EPMS = EPM mit 7% NaCl
Baz = Nach mikroskop. Untersuchung errechneter Bazillengehalt

ihrer extrem geringen Größe gut von den Kolonien grampositiver Kokken und aerober Sporenbildner abzugrenzen. Diese Kolonien wurden nicht ausgezählt und gingen nicht in die Berechnung der aeroben Sporenbildner ein.
Die Zahl der ausgezählten Kolonien auf EPM lag zwischen 2.00 und 6.96 und war teilweise höher als die aerobe Gesamtkeimzahl. Der Gehalt an aeroben Sporenbildnern schwankte zwischen < 2.00 und 4.85/g.
Die Koloniezahl auf EPMS betrug zwischen < 2.00 und 6.96, wobei sich die Zahl der kochsalztoleranten aeroben Sporenbildner zwischen < 2.00 und 6.93/g bewegte.
Eine Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich in Tab. 24.

Frisches Fleisch und spezielle Fleischerzeugnisse

Bei diesen Proben bewegte sich die aerobe Gesamtkeimzahl ($\log_x$) zwischen 4.18 und > 9.00. In 14 Fällen konnten die exakten Keimzahlen auf einzelnen Medien wegen Rasenwachstums nicht ermittelt werden. Betroffen waren hiervon 11 Proben.
Die Zahl der Kolonien/g lag auf EPM zwischen 4.11 und > 8.00, der Gehalt an aeroben Sporenbildnern zwischen < 3.00 und > 8.00. Bei drei Proben war Rasenwachstum zu verzeichnen. Bei weiteren sechs Proben bildeten grampositive Kokken einen so hohen Anteil der Kolonien, daß sich in der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe keine der mikroskopisch untersuchten Kolinien als aerober Sporenbildner erwies. Daher konnte für diese Lebensmittel der Gehalt an aeroben Sporenbildnern nicht exakt ermittelt werden.
Auf EPMS lag die Koloniezahl zwischen 3.84 und 5.66/g, wobei sich die Zahl der NaCl-toleranten Sporenbildner zwischen < 2.00 und 4.66 bewegte. Hier war bei 17 Proben der Gehalt an NaCl-toleranten Bacillus-Species nicht exakt zu bestimmen, da in der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe (10^{-2} bzw. 10^{-3}) kein Anteil an aeroben Sporenbildnern zu ermitteln war. Ein erkennbarer Zusammenhang zwischen der Keimzahl auf EPM und dem Gehalt an NaCl-toleranten Sporenbildnern bestand nicht.
Die genauen Ergenisse sind in Tab. 25 zusammengefaßt.

Tabelle 24 : Nachweis aerober Sporenbildner in verschiedenen Fleischerzeugnissen (Wurstwaren) mit der "drop-plating"-Methode ($\log_x$/g)

Lfd. Nr.	Art des Lebensmittels	aerobe GKZ	EPM Kz	EPM Baz	EPMS Kz	EPMS Baz	And. Mik.
1	Münchner Weißwurst	6.53	3.18	3.08	3.30	2.18	-
2	Münchner Weißwurst	6.48	2.48	<2.00	2.00	2.00	+
3	Münchner Weißwurst	2.85	2.78	2.78	2.00	2.00	+
4	Münchner Weißwurst	5.18	3.04	3.04	2.00	2.00	+
5	Berliner Bratwurst	5.60	4.11	3.60	3.20	2.30	+
6	Berliner Bratwurst	5.99	6.15	5.30	<2.00	<2.00	-
7	Bratwurst	4.53	5.15	5.15	6.48	6.36	+
8	Bratwurst	8.08	6.72	5.57	3.11	2.95	-
9	Rostbratwurst	3.04	2.93	2.93	<2.00	<2.00	-
10	Rostbratwurst	7.48	5.79	5.79	2.30	2.00	-
11	Rostbratwurst	4.58	3.68	3.68	<2.00	<2.00	-
12	Wiener Würstchen	3.26	2.48	2.48	<2.00	<2.00	+
13	Wiener Würstchen	7.59	6.96	<5.00	6.93	<5.00	-
14	Bockwurst	2.98	2.00	2.00	<2.00	<2.00	-
15	Bockwurst	6.65	6.18	<5.00	5.85	<5.00	-
16	Bockwurst mit Majoran	4.73	4.26	<3.00	4.11	2.18	+
17	Bockwurst mit Majoran	6.34	6.28	<5.00	6.00	<5.00	-
18	Berliner Jagdwurst	3.04	2.81	2.68	<2.00	<2.00	+
19	Berliner Jagdwurst	3.78	3.11	2.70	3.00	<2.00	-
20	Jagdwurst	3.08	2.95	2.85	<2.00	<2.00	-
21	Jagdwurst	3.78	2.60	2.60	2.30	2.00	-
22	Geflügelwurst m.gr.Pfeffer	3.00	2.70	2.70	2.48	2.00	-
23	Geflügelwurst m.gr.Pfeffer	3.48	2.30	2.00	<2.00	<2.00	-
24	Frische Leberwurst	4.81	4.85	4.85	3.90	3.90	-
25	Frische Leberwurst	4.65	4.62	4.62	3.61	3.61	-
26	Frische Blutwurst	4.96	4.79	4.79	4.65	4.65	-
27	Frische Blutwurst	4.76	4.78	4.78	3.95	3.95	-

GKZ = Gesamtkeimzahl nach DIN 10161
Kz = Koloniezahl (auf EPM wurden Mikrokolonien nicht gezählt)
EPM = EP-Agar (REUTER,1968) mit Mannitol u. Phenolrot
EPMS = EPM mit 7% NaCl
Baz = nach mikroskop. Untersuchung errechneter Bazillengehalt
And. Mik. = Vorkommen grampositiver, katalasenegativer Stäbchen auf EPM

Tabelle 25 : Nachweis aerober Sporenbildner in Frischfleisch mit der "drop-plating"-Methode (log_x/g)

Lfd. Nr.	Art des Lebensmittels	aerobe GKZ	EPM Kz	EPM Baz	EPMS Kz	EPMS Baz	And. Mik.
1	Schabefleisch	6.41	4.11	3.00	3.83	2.85	+
2	Schabefleisch	7.40	5.15	<4.00	4.80	4.28	+
3	Schabefleisch	6.64	4.18	3.76	3.48	2.00	+
4	Schabefleisch	6.99	4.56	4.04	4.46	3.00	+
5	Rinderhack	5.78	4.63	<3.00	4.72	<2.00	+
6	Rinderhack	7.26	5.20	5.04	4.60	<2.00	+
7	Rinderhack	>7.00	4.41	3.71	4.04	<2.00	+
8	Rinderhack	7.34	5.30	3.00	5.15	3.00	+
9	Schweinehack	7.08	6.56	5.34	4.70	<2.00	-
10	Schweinehack	>8.00	>7.00	>7.00	5.28	<3.00	-
11	Schweinehack	>8.00	>6.00	>6.00	4.56	<3.00	+
12	Schweinehack	8.00	5.34	4.34	5.23	<3.00	+
13	Schweineniere	6.57	4.62	<3.00	4.13	<3.00	+
14	Schweineniere	6.61	4.59	<3.00	4.41	<3.00	+
15	Schweineherz	7.38	5.53	5.43	4.15	<2.00	+
16	Schweinegulasch	>8.00	5.60	5.51	4.26	<2.00	+
17	Hühnerfleisch	>8.00	4.68	4.00	3.63	<2.00	-
18	Hühnerfleisch	>8.00	5.56	4.00	5.04	<3.00	-
19	Hühnerfleisch	>8.00	4.36	4.15	4.38	<3.00	-
20	"Gyros"	>8.00	6.54	5.20	5.40	4.54	+
21	"Gyros"	>8.00	6.88	6.83	5.15	4.44	+
22	"Gyros"	>9.00	>8.00	>8.00	5.66	4.66	+
23	"Gyros"	>8.00	5.49	5.90	4.91	4.20	+

GKZ = Gesamtkeimzahl nach DIN 10161
Kz = Koloniezahl (auf EPM wurden Mikrokolonien nicht gezählt)
EPM = EP Agar (REUTER, 1968) mit Mannitol u. Phenolrot
EPMS = EPM mit 7% NaCl
Baz = Nach mikroskop. Untersuchung errechneter Bazillengehalt
And. Mik. = Vorkommen grampositiver, katalasenegativer Stäbchen auf EPM

Bestimmung des Gehaltes an Bacillus-Sporen in Lebensmitteln

MPN-Methode

Bei 8 Lebensmitteln lag der Gehalt an Bacillus-Sporen über der Genauigkeitsgrenze der MPN-Methode. Zwei davon waren pasteurisierte Eiprodukte, der Rest entfiel auf Fleischprodukte, wobei besonders die "Gyros"-Proben mit durchweg hoher Sporen- und Gesamtkeimzahl auffielen.
Der Gehalt an Sporen NaCl-toleranter Bacillus-Species lag nur bei einer Brühwurst und den "Gyros"-Proben über der Nachweisgrenze der MPN-Methode.
In drei Proben waren keine Bacillus-Sporen zu erfassen. B. cereus wurde in 13 Proben nachgewiesen. Ein Wachstum von Begleitkeimen war in keinem Fall zu beobachten.
Alle Ergebnisse sind in Tabb. 26 und 27 zusammengefaßt.

"drop-plating"-Methode

Die im "drop-plating"-Verfahren untersuchten Gewürzproben wiesen einen aeroben Gesamtkeimgehalt von bis zu $\log_x = 6.61$ pro Gramm auf. Nur bei zwei Proben lag die aerobe Gesamtkeimzahl unter 2.00/g. Eine Zuordnung bestimmter Keimbelastungswerte zu einzelnen Produktgruppen (Samengewürze, Blattgewürze, Gewürzmischungen usw.) oder produktgruppenspezifische Unterschiede im Sporengehalt waren nicht zu verzeichnen.
Deutliche Unterschiede zeigten sich jedoch im Vergleich der verwendeten Medien. Die erzielten Sporenzahlen waren auf den beiden eigelbfreien Medien (WW, PFHG) fast immer höher als auf den eigelbhaltigen, wie die Abb. 3 deutlich zeigt. Die Differenz zu der geringsten Ausbeute betrug dabei bis zu zwei Zehnerpotenzen.
Verwertbare Unterschiede in der Ausbeute zwischen den eigelbhaltigen Grundmedien (EPM$^-$, MY) und deren Modifikationen mit Eisen- und Manganchlorid sowie Caseinhydrolysat traten im Gegensatz zu den Ergebnissen mit Reinkulturen nicht auf.
B. cereus wurde in 14 Proben nachgewiesen, wobei der Maximalwert von 3.00/g nur einmal erreicht wurde. Ein paralleler Nach-

Tabelle 26 : Nachweis von Bacillus-Sporen in Fleisch und Fleischerzeugnissen mit der MPN-Methode (log_x/g)

Lfd. Nr.	Art des Lebensmittels	aerobe GKZ	Bac.	Sporenzahl B.cer.	Sporenzahl NaCl-tol.
1	Münchner Weißwurst	6.53	1.36	< 0.48	1.36
2	Berliner Bratwurst	5.60	1.63	0.60	1.63
3	Bratwurst	4.53	>3.38	< 0.48	>3.38
4	Rostbratwurst	3.04	2.66	< 0.48	2.38
5	Wiener Würstchen	3.26	1.36	< 0.48	1.36
6	Bockwurst	2.98	1.63	< 0.48	1.63
7	Bockwurst mit Majoran	4.73	>3.38	0.60	2.66
8	Berliner Jagdwurst	3.04	2.66	< 0.48	2.66
9	Jagdwurst	3.08	2.66	0.60	2.66
10	Geflügelwurst m. gr. Pfeffer	3.00	3.04	< 0.48	2.66
11	Hühnerfleisch	>8.00	2.38	0.85	0.60
12	Hühnerfleisch	>8.00	2.18	< 0.48	2.18
13	Hühnerfleisch	>8.00	3.04	0.60	2.66
14	Schabefleisch	6.99	1.63	0.60	1.18
15	Schweinehack	>8.00	2.18	2.18	0.60
16	Rinderhack	7.43	1.36	< 0.48	0.60
17	"Gyros"	>8.00	>3.38	>3.38	>3.38
18	"Gyros"	>8.00	>3.38	>3.38	>3.38
19	"Gyros"	>9.00	>3.38	>3.38	>3.38
20	"Gyros"	>8.00	>3.38	>3.38	>3.38

GKZ = Gesamtkeimzahl nach DIN 10161
Bac. = Gesamtzahl der Bacillus-Sporen, Kontrolle auf EPM
B.cer. = B. cereus-Sporen, Kontrolle auf EPM
NaCl-tol.= Sporen NaCl.toleranter Bacillus-Species, Kontrolle auf EPMS

Tabelle 27 : Nachweis von Bacillus-Sporen in Trockennahrungsmitteln mit der MPN-Methode (log_x/g)

Lfd. Nr.	Art des Lebensmittels	aerobe GKZ	Sporenzahl Bac.	B.cer.	NaCl-tol.
1	Kinderbrei	3.78	1.97	< 0.48	1.97
2	"	5.45	2.38	< 0.48	1.97
3	"	3.08	0.95	< 0.48	0.60
4	"	< 2.00	0.95	< 0.48	0.95
5	"	2.76	3.04	1.36	2.38
6	"	< 2.00	0.60	< 0.48	< 0.48
7	Instant Vanillesoße	< 2.00	0.48	< 0.48	< 0.48
8	Inst. Grieß-Pudding	2.30	0.60	< 0.48	0.60
9	Vanille-Soßenpulver	3.15	3.04	< 0.48	3.04
10	Grieß-Milch-Brei	3.71	< 0.48	< 0.48	< 0.48
11	past. sprühgetr. Eiweiß	3.00	2.38	< 0.48	1.97
12	" " "	3.30	3.04	< 0.48	1.63
13	" " "	2.60	> 3.38	1.04	1.45
14	" " "	3.30	2.38	< 0.48	1.32
15	" " "	2.60	3.04	< 0.48	> 3.38
16	past. sprühgetr. Eigelb	2.30	< 0.48	< 0.48	< 0.48
17	" " "	2.30	0.60	< 0.48	0.60
18	past. sprühgetr. Vollei	3.11	2.38	< 0.48	0.85
19	" " "	3.20	> 3.38	0.60	> 3.38
20	" " "	2.90	2.32	< 0.48	1.04
21	" " "	2.85	1.97	< 0.48	1.32
22	" " "	3.34	2.18	< 0.48	2.18
23	" " "	3.00	2.66	< 0.48	1.45

GKZ = Gesamtkeimzahl nach DIN 10161
Bac. = Gesamtzahl der Bacillus-Sporen, Kontrolle auf EPM
B.cer. = B. cereus-Sporen, Kontrolle auf EPM
NaCl-tol. = Sporen NaCl-toleranter Bacillus-Species, Kontrolle auf EPMS

weis dieser Species auf allen eigelbhaltigen Nährmedien war nur bei einer Probe zu verzeichnen. In 6 Fällen wuchsen nur auf je einem dieser Medien für B. cereus charakteristische Kolonien. Auf dem selektivstofffreien EPM-Agar (EPM^-) konnte B. cereus in 11 Proben nachgewiesen werden, mehr als doppelt so oft wie auf den anderen eingesetzten Medien.
Eine detaillierte Aufstellung der gewonnenen Ergebnisse findet sich in Tab. 28.

Tab. 28 : Nachweis von Bacillus-Sporen in Gewürzen
Plattenkultivierungsverfahren mit verschiedenen Germinationsmedien

	aerobe GKZ	PFHG	WW	EPM⁻	EPM⁻/WW I	EPM⁻/WW II	MY	MY/WW I	MY/WW II
1 Paprika	6.49	6.45	6.49	6.32	6.15	6.36	6.00	6.30	6.34
2	< 2.00	2.00	2.00	2.30	< 2.00	< 2.00	< 2.00	< 2.00	2.30
3 Muskatblüte, gem.	5.93	3.49	3.00	3.39 2.30+)	3.36 2.48+)	3.28	3.49	3.50	3.55
4 Curry	6.58	6.52	6.32	6.04 2.00+)	5.78	5.90	5.36	5.66	5.30
5 Muskatnuß, gem.	4.26	4.10	4.16	3.30	3.43	3.15	2.60	3.00	2.78
6 Kräuterbuttergewürz	6.48	6.23	6.30	6.00 2.70+)	6.00	6.23 2.30+)	5.53	6.00 2.30+)	6.04
7 Nelken	6.11	< 2.00	2.00	< 2.00	< 2.00	< 2.00	< 2.00	< 2.00	< 2.00
8	4.95	4.16	3.48	3.41	3.49	3.34	3.23	3.42	3.38
9 Cardamom	5.87	5.69	5.51	5.38 2.48+)	5.18	5.43	5.15 2.48+)	5.32	5.40
10 Backgewürz	5.54	5.11	5.04	4.38	5.79	4.57	4.20	4.32	4.38
11 Majoran	5.45	4.93	4.71	4.78	4.53	5.20	4.08	4.53	4.60 2.00+)

Fortsetzung Tab. 28

	aerobe GKZ	PFHG	WW	EPM⁻	EPM⁻/WW I	EPM⁻/WW II	MY	MY/WW I	MY/WW II
12 Bohnenkraut	5.38	5.3o	5.o4	3.7o	3.2o	3.oo	3.6o	3.45	3.15
13	3.76	4.4o	3.85	3.52	3.49	3.55	3.2o	3.59	3.5o
14	5.51	4.48	4.62	3.54 2.6o+)	3.3o 2.oo+)	3.37	3.o4 2.oo+)	3.59	3.84
15 Steak-Grill-Gewürz	6.57	6.38	6.53	6.15	6.18	6.oo	5.26	5.95	5.85
16 Kräuter d.Provence	5.58	5.oo	5.15	4.23	4.3o	4.23	3.78	4.o4	3.9o
17 Estragon	5.o8	3.11	2.78	2.78	2.48	2.48	< 2.oo	2.3o	2.oo
18	4.o1	< 2.oo	2.6o	< 2.oo	2.3o	2.oo	2.48	< 2.oo	2.oo
19	6.o4	5.89	6.o3	5.8o	5.57	5.64	5.36	5.76	5.7o
20 Oregano	5.3o	4.58	4.34	2.9o	3.o4	3.o8	2.6o	3.41	3.15
21	4.91	4.18	3.5o	2.3o	2.6o	2.85	2.3o	2.98	2.78
22 Kräutermischung	5.56	3.32	3.oo	2.48	2.7o	< 2.oo	2.oo	2.9o	2.7o
23 grüner Pfeffer	2.85	< 2.oo	2.48	2.48	2.6o	3.oo	< 2.oo	< 2.oo	< 2.oo
24 Beifuß	5.2o	4.23	4.28	4.15	4.oo	3.95 2.oo+)	3.43	3.7o	3.95
25 Cayennepfeffer	6.61	6.51	6.26	5.26 3.oo+)	5.78	5.7o	5.59	6.o4 2.oo+)	6.oo
26 Salbei	4.26	3.58	3.18	3.11 2.oo+)	3.18	2.95	2.6o	2.85	2.85
27									
28	3.46	3.26	3.12	< 2.oo	< 2.oo	< 2.oo	< 2.oo	< 2.oo	< 2.oo
29 Wacholderbeeren	< 2.oo	< 2.oo	<2.oo	< 2.oo	< 2.oo	< 2.oo	< 2.oo	< 2.oo	< 2.oo
	4.32	4.3o	4.o9	3.74	3.39	3.32	3.48	3.61	3.41

Fortsetzung Tab. 28 :

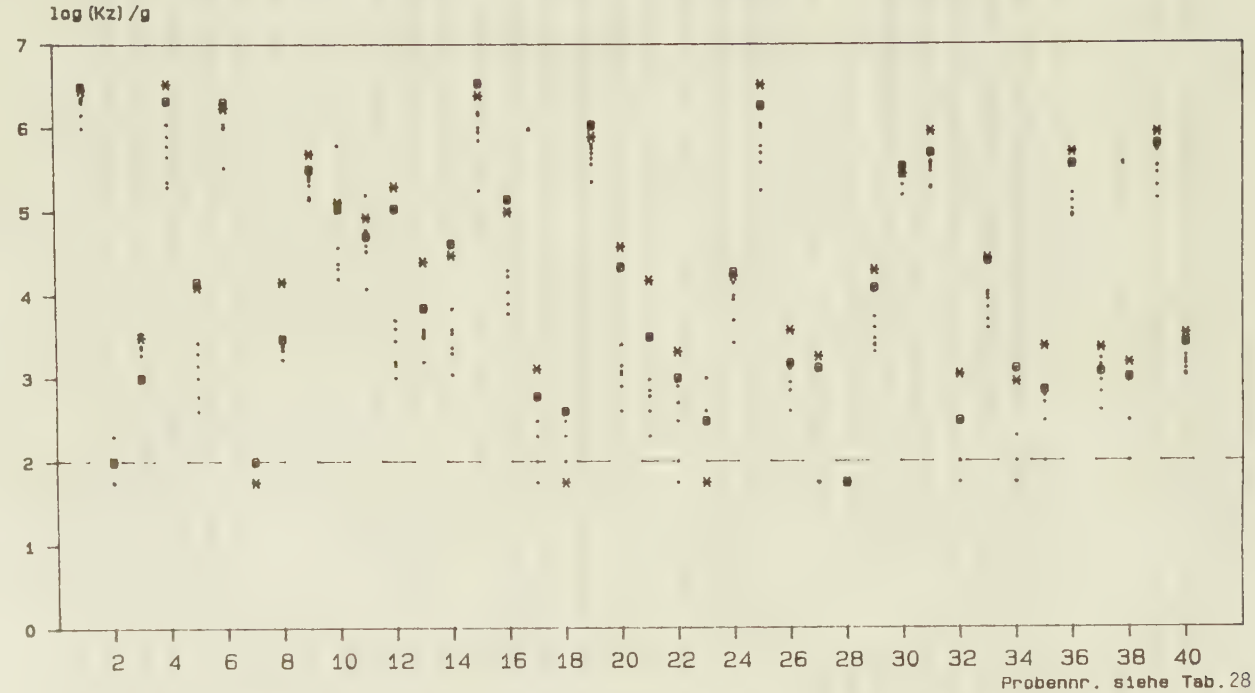
	aerobe GKZ	PFHG	WW	EPM⁻	EPM⁻/WW I	EPM⁻/WW II	MY	MY/WW I	MY/WW II
30 Liebstöckel	5.86	5.45	5.54	5.49	5.48 2.06+)	5.45	5.2o 3.oo	5.41 2.7o	5.32
31 Dillspitzen	6.46	5.95	5.7o	5.58 2.78+)	5.6o 2.48+)	5.3o 2.7o+)	5.28 2.3o+)	5.53 2.3o+)	5.48 2.48+)
32 Petersilie	3.77	3.o4	2.48	2.oo	< 2.oo	2.48	< 2.oo	2.oo	2.oo
33 Rosmarin	4.61	4.44	4.41	4.o4 2.7o+)	3.95	3.7o	3.6o	3.85	4.oo
34 Lorbeerblätter	3.37	2.95	3.11	2.oo	< 2.oo	2.3o	< 2.oo	< 2.oo	< 2.oo
35 Kerbel	3.49	3.38	2.85	2.oo+)	2.7o	2.48	2.oo	2.78	2.oo
36 Basilikum	6.34	5.7o	5.56	5.12 2.oo+)	5.21 2.3o+)	4.95	4.93 2.7o+)	5.o2	4.96 2.oo+)
37 Macisblüte	4.21	3.36	3.o7	3.23	3.o9	2.96	2.6o	3.15	2.82
38 Kümmel	3.21	3.18	3.oo	2.48	2.48	2.48	2.oo	2.oo	2.oo
39 Brathähnch.-Gewürz	5.84	5.93	5.79	5.71	5.53	5.54	5.3o	5.15	5.45
40 Zimt	3.73	3.53	3.42	3.16	3.1o	3.o2	3.o4	3.26	3.21

GKZ = Gesamtkeimzahl nach DIN 10161

+) = B. cereus-Sporen

Verwendete Medien siehe Tab. 11

Abb. 3: Nachweis von Bacillus-Sporen in Gewuerzen
Plattenkultivierungsverfahren mit verschiedenen Germinationsmedien



o Germinationsmedium nach WALLEN und WALKER (1979)
* PFHG-Agar nach REUTER (1968)
. eigelbhaltige Medien, nicht aufgeschluesselt
--- Nachweisgrenze des Verfahrens

4. Besprechung der Ergebnisse

4.1 Brauchbarkeit gebräuchlicher Selektivmedien für die selektive Erfassung aerober Sporenbildner aus Lebensmitteln

Hinsichtlich des Wachstums konnten die von REUTER (1968) nach der Prüfung von EP und MYP getroffenen Aussagen bestätigt werden. Hier zeigten sich auf den Selektivmedien oftmals bessere Ergebnisse als auf PFHG-Agar. Wie jedoch HARMON et al. (1984) bei der Prüfung von PEMBA feststellten, kann ein großflächiges Wachstum der Kolonien die quantitative Auswertung erheblich erschweren. Diese Aussagen können nach den vorliegenden Untersuchungen unterstrichen werden.

Im Gegensatz zu der von REUTER (1970) gemachten Beobachtung einer im Unterschied zu MYP abgeschwächten oder verzögerten Eigelbreaktion auf EP war diese Reaktion bei allen getesteten Medien nach 48-stündiger Bebrütung gut erkennbar. Eine Ausnahme bildete hier der PEMBA. Während HARMON et al. (1984) die oftmals zu schwache Erkennbarkeit der fehlenden Mannitolverwertung durch B. cereus bemängelten, war die Blaufärbung des Mediums durch Alkalisierung bei den vorliegenden Untersuchungen gut ausgeprägt. Auch andere Autoren (PETERZ et al., 1985) hatten keine Probleme mit der Ablesung der fehlenden Mannitolverwertung von B. cereus auf PEMBA. Bei der vorliegenden Untersuchung war die Alkalisierung (Blaufärbung) teilweise so stark ausgeprägt, daß die Ablesung der Eigelbreaktion beeinträchtigt wurde.

Die Erkennung von B. cereus durch kombinierte Ablesung zweier biochemischer Merkmale wurde bereits von INAL (1971; 1972) als optimal angesehen. Auch in den eigenen Untersuchungen konnte festgestellt werden, daß die Beschränkung auf die Lecithinasereaktion bei der Erfassung dieser Species keine ausreichende Sicherheit bot.

Die schlechte selektive Wirkung einiger geprüfter Medien auf die Begleitflora wurde bereits von verschiedenen Autoren bemängelt (REUTER, 1968; INAL, 1971 u. 1972; PETERZ et al., 1985). Ähnliche Erfahrungen mußten auch in den vorliegenden Untersuchungen gemacht werden.

Das EP-Medium erwies sich als für die Erfassung der Gattung Bacillus am besten geeignet. Der gramnegative Anteil der Begleitflora wurde vollständig gehemmt. Bei den grampositiven Mikroorganismen, die in Lebensmitteln als Begleitkeime ebenfalls eine bedeutsame Rolle spielen, konnte jedoch nicht nur für Mikrokokken und Sc. faecalis (REUTER, 1970), sondern auch für Staphylokokken und weitere Streptokokken ein Wachstum nachgewiesen werden. Eine indirekte Ermittlung des Gehaltes an aeroben Sporenbildnern durch Mitführung eines Selektivmediums für Micrococcaceae und Ermittlung der Keimzahldifferenz ist demnach wegen des Wachstums einiger Streptokokken nicht möglich.

Für die gezielte Erfassung von B. cereus auf EP ist von Nachteil, daß sich dieses Medium auf den Nachweis der Lecithinasebildung als kennzeichnende Reaktion beschränkt. Somit ist die Bestätigung von präsumptiven B. cereus-Kolonien durch Zusatztests notwendig.

4.2 Möglichkeiten zur Abgrenzung der Bazillen von der unerwünschten Begleitflora

Die Versuche zur Abgrenzung der Bazillen von mitwachsenden grampositiven Kokken scheiterte nicht nur an deren ausgeprägter Widerstandsfähigkeit gegenüber denjenigen selektiven Stoffen, die auch das Wachstum von Bazillen ermöglichten. Als Nachteil erwiesen sich auch die uneinheitlichen Reaktionen innerhalb der Gattung und einzelner Species gegenüber üblichen biochemischen Tests.

So unterstrich bereits BASTAR (1975), daß zu Identifizierung von Bazillen stets die kombinierte Beobachtung mikroskopischer, biochemischer und physiologischer Merkmale notwendig ist und die Beschränkung auf eine Merkmalsgruppe zu Fehlern führen kann.

CANDELI et al. (1979) untersuchten 23 Stämme von B. megaterium, die fast ausschließlich den Sammlungen ATCC (American Type Culture Collection), NCTC (National Collection of Type Cultures) und CCM (Czechoslovak Collection of Microorganisms) entstammten. Es stellte sich heraus, daß die Stämme in 10 biochemischen Eigenschaften differierten und die Verwandtschaft nur durch ihre DNA-Basenkombination nachweisbar war.

Auch WILLEMSE-COLLINET et al. (1980) konnten mit einer Identifizierungsmatrix unter Verwendung von 24 biochemischen Tests nicht alle untersuchten Bacillus-Stämme eindeutig einer Species zuordnen. Auch die Trennung von B. subtilis und B. amyloliquefaciens gelang O'DONNELL et al. (1980) nur mit DNA-Hybridisierung und Gaschromatographie, nicht aber mit klassischen biochemischen Untersuchungen.

Ähnliche Ergebnisse, die in der vorliegenden Untersuchung gewonnen wurden, bestätigten ebenfalls die nach klassischer Bakteriologie bestehende Inhomogenität dieser Gattung, die sich auch in einer wissenschaftlich unbefriedigenden Lösung der Taxonomie äußert (HARTUNG, 1985).

Diese Tatsache wirkt sich offensichtlich auch auf die Versuche aus, Gattungs- oder Species-spezifische Selektivmedien zu schaffen.

Ein Beispiel ist die Lecithinasebildung, die MC GAUGHEY und CHU (1948) noch für ein charakteristisches Merkmal der Species B. cereus hielten. Die Autoren benutzten diese Eigenschaft sogar für die Neugruppierung einiger getesteter Stämme. Für die Entwicklung von B. cereus-Selektivmedien erschien die Eigelb-

reaktion zunächst als ausreichendes Kriterium. BERKEL und HADLOK (1976) wiesen auch bei B. pumilus, B. subtilis und B. licheniformis zahlreiche Stämme mit Lecithinase nach, wogegen einigen geprüften B. cereus-Stämmen diese Eigenschaft fehlte. Aus diesem Grund werden heute zur selektiven Kultivierung von B. cereus zumeist Medien mit kombininierter Ablesung von Eigelb- und Mannitolspaltung verwendet. Zur Absicherung der Diagnose können weitere biochemische Bestätigungsreaktionen angeschlossen werden.

4.3 Erfassung von Zielkeimgruppen innerhalb der Gattung Bacillus

Nach den zuvor geschilderten Schwierigkeiten lag es nahe, die Abgrenzung von Zielkeimgruppen innerhalb der Gattung Bacillus anzustreben. Bereits praktiziert ist die Erfassung von B. cereus als Zielkeimgruppe.

Die Möglichkeit zur Erfassung einer weiteren Zielgruppe wird in der selektiven Wirkung eines bestimmten NaCl-Gehaltes gesehen. Wachstum bei 7% Kochsalz im Medium ist ein Differenzierungskriterium innerhalb des Genus Bacillus. Die potentiellen Toxinbildner fallen hierbei in die Gruppe der kochsalztoleranten Species (GORDON, 1977).

Bereits 1945 entwickelte CHAPMAN ein Selektivmedium für Staph. aureus, dessen hemmende Wirkung auf die Begleitflora auf einem 7,5%igen Kochsalzanteil beruhte.

Bei der praktischen Erprobung von Medien mit erhöhtem Kochsalzanteil (5% und 7% Kochsalz im Medium) bestätigten sich die Literaturangaben hinsichtlich der Kochsalztoleranz potentiell toxinogener Bacillus-Species und Staph. aureus. Lediglich B. cereus zeigte bei den geprüften Kochsalzkonzentrationen unerwartet reduzierte Anwachsraten. Ähnliche Ergebnisse erhielten bereits NIKODEMUSZ (1962) und MOSSEL et al. (1967). Erhöhter NaCl-Gehalt war also als alleinige selektive Komponente zur Er-

fassung von B. cereus nicht geeignet. Da die anderen toxinogenen Stammformen unter den Bazillen auf EPMS gute Anwachsraten zeigen und zudem B. cereus auf dem entwickelten EPM problemlos selektiv quantitativ zu erfassen ist, kann der Gehalt an potentiell toxinogenen Bacillus-Species unter parallelem Einsatz dieser beiden Medien zufriedenstellend ermittelt werden.

Problematisch war die hohe Kochsalztoleranz von Mikrokokken und Staphylokokken, deren Wachstum sich nicht ausschalten ließ. Zur sicheren Unterscheidung zwischen Bazillen allgemein bzw. NaCl-toleranten Species und den mitwachsenden Kokken muß bei den Selektivmedien mangels anderer Möglichkeiten auf die mikroskopische Untersuchung von Grampräparaten zurückgegriffen werden.

4.4 Medien und Methoden zur Erfassung von Bacillus-Sporen

Die kurzzeitige Erhitzung des Untersuchungsgutes zur Aktivierung und selektiven Erfassung von Sporen aerober Sporenbildner wird bereits praktiziert (SCHMIDT-LORENZ, 1980-1983). Die Verbindung von Erhitzung mit der Anwendung einer Plattenmethode ergibt jedoch bei Keimzahlen unter 10^3 pro g oder ml ein ungenaues oder gar kein Ergebnis.

Hier bietet sich die Kultivierung in flüssigen Medien und die Auswertung mit der MPN-Methode an, die beispielsweise bei der Isolierung geringer Keimzahlen von Coliformen, faekalen Streptokokken oder Ps. aeruginosa aus Wasser angewendet wird (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1976).

Als geeignetes Kultursubstrat für diese Technik erwies sich TSB. Dieses Medium wurde auch in der Literatur in Verbindung mit der MPN-Methode als optimales flüssiges Germinationsmedium für Bacillus-Sporen genannt (BLOCHER u. BUSTA, 1982). Eine abschließende Plattenkontrolle der bewachsenen Bouillon ist allerdings aus mehreren Gründen nötig.

Einerseits bewirken viele Lebensmittel trotz Verdünnung eine so starke Trübung oder Verfärbung der Flüssigkultur, daß eine Beurteilung des Wachstums anhand der Trübung der Bouillon nicht möglich ist, andererseits sind bestimmte Species oder Gruppen innerhalb der Bazillen (B. cereus, NaCl-tolerante Species) nur aufgrund charakteristischer Reaktionen auf festen Nährböden zu ermitteln. Der Gehalt der Platten an Selektivstoffen wirkt sich nicht negativ auf die Keimausbeute aus, da die Sporen in der Bouillon die Möglichkeit zur Regeneration und Germination hatten. Ein direktes Ausbringen hitzeaktivierter Sporen auf stark kochsalzhaltige Medien könnte problematisch sein, da eine Hitzebehandlung die NaCl-Empfindlichkeit von Bacillus-Sporen erhöht (BRIGGS u. YAZDANY, 1970).

Die erforderliche minimale Erhitzungstemperatur für die vollständige Abtötung der Begleitflora lag bei 75 °C. Diese Ergebnisse stimmen mit den in der Literatur veröffentlichten Werten (OBIGER, 1976) gut überein.

In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage nach der Zusammensetzung eines Kulturmediums für die Erfassung höherer Sporenzahlen. Bisher werden zu diesem Zweck selektivstoffhaltige Medien eingesetzt (SCHMIDT-LORENZ, 1980-1983). Da die Begleitflora erwiesenermaßen durch einen ausreichenden Erhitzungsprozeß ausnahmslos abgetötet wird, könnte auf einen Zusatz von Selektivstoffen aus ökonomischen Gründen verzichtet werden.

BLOCHER und BUSTA (1982) konnten zwar feststellen, daß sich der Polymyxinanteil im MYP-Agar nicht negativ auf die Germinationsrate auswirkt, ein Vorteil durch Zeit- und Materialersparnis ist jedoch gegeben. Hier sei an die Forderung REUTERs (1970) nach leichter Herstellbarkeit der bei selektiven Methoden verwendeten Medien erinnert.

Die Vermutung von BLOCHER und BUSTA (1982), ein Eigelbanteil am Medium könnte einen positiven Einfluß auf die Sporen haben und somit die Keimausbeute verbessern, kann nicht bestätigt werden.

Das eigelbfreie Medium nach WALLEN und WALKER (1979), das ursprünglich für die Erfassung H_2O_2-geschädigter Bacillus-Sporen entwickelt worden war, erwies sich gegenüber den geprüften eigelbhaltigen Medien als durchaus gleichwertig. Wenn in den vorliegenden Untersuchungen und auch von anderen Autoren die aufwendigeren Eigelbmedien verwendet werden (JOHNSON et al., 1982, 1983; JOHNSON u. BUSTA, 1984), so liegt dies an der bestehenden Möglichkeit, neben der Gesamtzahl der Sporen gezielt den Anteil von B. cereus zu erfassen.

Daß Sporen unterschiedliche Anforderungen an ein Germinationsmedium stellen, wurde bei den geprüften Stämmen von B. megaterium und B. firmus deutlich (siehe Tab. 21). Bei dem B. firmus-Stamm kann vermutet werden, daß sich der Zusatz von Eigelb und/oder Mannitol negativ auf die Germination auswirkte, da sich die Modifikation MY/WW II nur durch diese Zusätze vom bewachsenen WW-Medium unterschied.
Bei den geprüften B. megaterium-Stämmen zeigte sich ein positiver Effekt von Eisen- und Mangansulfat. Das fehlende Wachstum auf EPM$^-$ und dessen Modifikationen kann nur auf den unterschiedlichen Gehalt an Salzen zurückzuführen sein.

4.5 Eigene Erkenntnisse zur Isolierung von aeroben Sporenbildnern aus Lebensmitteln.

Die Erkenntnisse aus den Untersuchungen von Lebensmittelproben bestätigten die bekannte Tatsache, daß mit definierten Kulturen gewonnene Ergebnisse nicht grundsätzlich auf native Proben übertragen werden können. Dies zeigte sich deutlich an der nicht zuverlässigen Möglichkeit zur makroskopischen Abgrenzung von Bacillus-Kolonien bei Lebensmittelproben.

Bei den geprüften Gewürzproben bestätigten sich die von HARTGEN und KAHLAU (1985) gewonnenen Ergebnisse, nach denen die Gesamtkeimzahl von Gewürzen oft ganz oder wesentlich von den aeroben Sporenbildnern bestimmt wurde.

Während jedoch MASSON und VANOS (1982) aus von ihnen untersuchten Gewürzen B. subtilis und B. licheniformis nicht isolieren konnten, spielten diese Species bei SEENAPPA und KEMPTON (1981) eine bedeutende Rolle innerhalb der Gewürzflora. Bei PALUMBO et al. (1975) war B. subtilis sogar der dominierende Keim in den geprüften Gewürzen.

Im vorliegenden Fall waren die aus Gewürzen isolierten Sporenbildner fast ausnahmslos kochsalztolerant. Da außer B. subtilis und B. licheniformis nur vier weitere Bacillus-Species NaCl-tolerant sind (siehe 2.2.1), ist mit großer Sicherheit zu vermuten, daß diesen Species eine größere Bedeutung zukommt, als die Ergebnisse von MASSON und VANOS (1982) vermuten lassen.

Bei der Untersuchung der Wurstproben war auffällig, daß die Zahl der Kolonien auf EPM teilweise über der aeroben Gesamtkeimzahl des sonst dafür üblichen PFHG-Mediums lag. Diese Ergebnisse verdeutlichen die für die Bazillen optimale Zusammensetzung dieses Selektivmediums.

Der Nachweis von aeroben Sporenbildnern in fast 90% der Proben deckt sich mit den Ergebnissen von FRANKSEN et al. (1969), die bei 93% der untersuchten Brühwürste Bazillen nachweisen konnten. Der Anteil der Proben, bei denen die Mikroflora überwiegend aus aeroben Sporenbildnern bestand (ca. 50%), kommt den von KABUCZU et al. (1972) veröffentlichten Werten von Leberwürsten sehr nahe.

Die NaCl-toleranten Species spielten bei den untersuchten Proben nicht die Rolle, die nach den Angaben aus der Literatur (z.B. BERKEL u. HADLOK, 1976a) zu erwarten war. Nur bei den geprüften Kochwürsten machten sie den Großteil der aeroben Sporenbildner aus.

Bei der Untersuchung von rohen Fleischerzeugnissen fiel der sehr hohe aerobe Gesamtkeimgehalt der sog. Gyros-Produkte auf. "Gyros", oder besser "Zerkleinertes Schweinefleisch, nach Gyros-Art gewürzt" (MURMANN et al., 1985) ist ein küchenfertiges, ge-

würztes und zumeist mit Zwiebeln vermengtes Produkt, das der griechischen Spezialität Gyros nachempfunden ist. Die untersuchten Proben wiesen eine aerobe Gesamtkeimzahl von über 8.00 und einen Gehalt an aeroben Sporenbildnern von 5.00 ($\log_x$/g) und weit darüber auf. Diese Zahlen liegen erheblich über den von MURMANN et al. bei ihren Untersuchungen gewonnenen Werten.

Es ist zu vermuten, daß eine Hauptkontaminationsquelle in den verwendeten Gewürzen besteht. Kontaminierte Gewürze nahmen auch PALUMBO et al. (1975) als Grund für die hohe Zahl der von ihnen aus Wurstproben isolierten Sporenbildner an.

Bemerkenswert ist weiterhin der niedrige Anteil NaCl-toleranter Species innerhalb der Gesamtzahl aerober Sporenbildner. Eine Ausnahme bildeten hier lediglich die gewürzten "Gyros"-Proben. Auch in diesem Fall kann die Ursache dafür in den in diesem Produkt reichlich vorhandenen Gewürzen vermutet werden.

Es ist anzunehmen, daß technologische Verfahrensweisen bei der Herstellung von Lebensmitteln, z.B. Hitzeeinwirkung jeglicher Art, das Vorhandensein von NaCl-toleranten Species begünstigen. So fanden JOHNSON et al. (1982), daß bestimmte Bacillus-Stämme während einer Erhitzung länger in der hitzeunempfindlichen Ruhephase verweilten als andere Stämme, die schon bei geringeren Temperaturen aktiviert wurden. Da die Hitzeempfindlichkeit aktivierter Sporen sich nicht von der vegetativer Zellen unterscheidet, überstehen solche Stämme eine Erhitzung am besten, die am längsten in der Ruhephase verblieben.

Bereits 1977 stellten GILBERT und PARRY fest, daß der Kochprozeß bei Reis eine tiefgreifende Umschichtung innerhalb der Gruppe der aeroben Sporenbildner bewirkte.

Eine weitere Erkärung für den hohen Anteil NaCl-toleranter Species an der Flora erhitzter oder getrockneter Lebensmittel wäre deren ausgeprägtere Tendenz zur Versporung.

4.6 Eigene Erkenntnisse zur Isolierung von Bacillus-Sporen aus Lebensmitteln

Die Ergebnisse der Untersuchungen von Lebensmitteln zeigen, daß auch bei der Untersuchung von Nativproben eine 10-minütige Heißhaltung bei 80 °C eine vollständige Abtötung der Begleitkeime bewirkt. Daraus ergibt sich, daß bei der Bestimmung höherer Sporenzahlen mit einer Plattenmethode die Verwendung eines Selektivmediums unnötig ist. Statt die hitzeaktivierten Sporen einem möglichen Streß durch beigefügte Selektivstoffe auszusetzen, könnte man sie mit einem optimalen Germinationsmedium in höchstmöglicher Zahl erfassen.

Bei 75% der mit der MPN-Methode untersuchten Proben lag der Gehalt an Bacillus-Sporen innerhalb der Nachweisgrenze dieser Methode, die auch extrem niedrige Sporengehalte noch erfaßte. Bei unsachgemäßer Zubereitung und/oder Aufbewahrung eines zuvor hitzebehandelten Lebensmittels können aber selbst diese geringen Ausgangskeimzahlen von Bedeutung sein, da die Sporenbildner in diesen Fällen durch Hitzeaktivierung der Sporen und Abtötung der Begleitflora in Reinkultur vorliegen und so optimale Vermehrungsbedingungen vorfinden.

Hier sei an die Untersuchungsergebnisse von BUTTIAUX und BEERENS (1968) erinnert, die aus vorschriftsmäßig zubereiteten, anschließend jedoch unsachgemäß gelagerten Trockensuppen mehr als 10^6 aerobe Sporenbildner/g isolierten, obwohl die gebrauchsfertigen Trockenprodukte nicht mehr als 10^2 B. cereus-Sporen pro g enthielten.

Auch BLAKEY und PRIEST (1980) konnten die potentielle Gefährdung durch gekochte und anschließend unsachgemäß aufbewahrte Trockennahrungsmittel beweisen, obwohl diese Produkte teilweise einen Ausgangskeimgehalt von nur 10^2 pro g aufwiesen.

Beim Vergleich der gewonnenen Ergebnisse fällt das Verhältnis zwischen dem Gehalt an Bacillus-Sporen insgesamt und dem der

NaCl-toleranten Species auf. Bei einem großen Teil dieser geprüften Instant-Lebensmittel wurden überwiegend oder ausschließlich Sporen NaCl-toleranter Species gefunden. Wie bereits dargestellt, könnte eine höhere Thermotoleranz oder eine ausgeprägtere Tendenz zur Versporung bei den NaCl-toleranten Species im Vergleich zu den übrigen Bazillen gegeben sein.

Bei den 40 mit der "drop-plating"-Methode untersuchten Gewürzproben überschritten die aeroben Gesamtkeimzahlen den Wert von $\log_x$ 6.00 Keimen/g nur in wenigen Fällen und lagen damit unter den von HARTGEN und KAHLAU (1985) gewonnenen Werten. Übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Autoren wurde die aerobe Gesamtkeimzahl im wesentlichen von Bazillen bestimmt.

Eine hohe Keimbelastung bei Gewürzen, die $\log_x$ 7.00 Keime/g und mehr betragen kann, ist nicht außergewöhnlich, stellt jedoch eine Kontaminationsquelle für andere Lebensmittel dar. Dies ist besonders unter dem Gesichtspunkt von Bedeutung, daß Gewürze bei ihrer Verwendung im Haushalt meist am Ende eines Kochvorganges den Speisen beigefügt werden. Die Hitze reicht dann zwar zur Aktivierung vorhandener Sporen, nicht aber zur Abtötung der Keimflora aus.

Auf die Bedeutung des mikrobiologischen Status von Gewürzen für Fleischerzeugnisse haben HENNER et al. (1983) nachdrücklich hingewiesen.

Bei den Untersuchungen von SEENAPPA und KEMPTON (1981), die aus Indien stammende Gewürze prüften, spielte B. cereus eine bedeutende Rolle innerhalb der Bacillus-Flora. Ähnliches konnte allerdings bei den vorliegenden Untersuchungen nicht ermittelt werden. B. cereus wurde hier nur aus gut einem Drittel der Proben isoliert, wobei die maximale Ausbeute bei $\log_x$ 3.00/g lag.

Ähnliche Werte erzielten auch MASSON und VANOS (1982), die maximal $\log_x$ 4.04 B. cereus/g aus den von ihnen untersuchten Gewürzproben isolierten.

Hinsichtlich der Anwachsrate der Sporen auf den verschiedenen geprüften Germinationsmedien zeigte sich auch bei den Nativproben, daß komplexe, nährstoffreiche Medien die erzielbare Keimzahl nicht erhöhen. Es war im Gegenteil eine teilweise deutliche Reduzierung der Anwachsraten gegenüber denen auf eigelbfreien Medien zu beobachten. Somit kann die Vermutung, ein Faktor im Eigelb würde die Sporenausbeute bei Bazillen verbessern (BLOCHER u. BUSTA, 1982), nicht bestätigt werden.

Im Gegensatz zu den Versuchen mit Reinkulturen zeigte sich bei den nativen Proben auf eigelbhaltigen Medien kein positiver Effekt von Eisen- und Mangansulfat bzw. Caseinhydrolysat. Die Häufigkeit von B. cereus-Isolierungen lag auf einem unmodifizierten Medium (EPM^-) sogar am höchsten. Ob der Grund hierfür in einer verringerten Anwachsrate dieser Species oder in einer Abschwächung der typischen Eigelbreaktion durch die Zusatzstoffe lag, konnte nicht geklärt werden.

4.7 Vorschlag einer Methodenstrategie für die Untersuchung von Lebensmitteln auf aerobe Sporenbildner

4.7.1 Ermittlung der Gesamtzahl mesophiler aerober Sporenbildner sowie NaCl-toleranter Bacillus-Species und B. cereus aus Lebensmitteln mit dem Plattenkultivierungsverfahren (Abb. 4)

Probenaufarbeitung (a), Verdünnung (b) und Beimpfung der Selektivmedien (c) erfolgen in Anlehnung an DIN 10161. Die verwendeten Nährböden sind EPMS für die Erfassung NaCl-toleranter Bacillus-Species sowie EPM für die Bestimmung der mesophilen aeroben Sporenbildner und B. cereus. Nach 48-stündiger Bebrütung bei 30 °C (d) werden auf EPMS alle, auf EPM nur Kolonien mit einem Durchmesser von >1 mm gezählt (e). Auswertbar sind dabei nur solche Sektoren der Platten, die bis ca. 150 gut voneinander abgesetzte Einzelkolonien aufweisen. Es werden jeweils die entsprechenden Sektoren mit der niedrigsten und der nächsthöheren auswertbaren Verdünnungsstufe ausgezählt. Je 10 Kolonien der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe pro Medium werden einer Gramfärbung mit anschließender mikroskopischer Untersuchung unterzogen (f). Auf EPM werden gesondert rosafarbene Kolonien mit einer Trübungszone im Medium als B. cereus erfaßt (e). Die Zahlen der nach (e) bestimmten Kolonien werden in die Berechnungsformel nach DIN 10161 Teil 2 eingesetzt. Unter Berücksichtigung der ausgezählten Verdünnungsstufen ergibt sich der Gehalt an B. cereus direkt, der Gehalt an mesophilen aeroben Sporenbildnern und an NaCl-toleranten Bacillus-Species nach Berechnung des prozentualen Anteils der Stäbchen an der Koloniezahl (g).

4.7.2 Ermittlung der Bacillus-Sporen-Gehalte mit der MPN-methode bzw. mit einer Plattenzählmethode (Abb. 5)

Ausgangsmaterial ist in jedem Fall eine homogenisierte 1:10-Verdünnung des zu untersuchenden Lebensmittels (a). 5 ml des Homogenisates werden für 10 min in einem auf 80 °C temperierten

Wasserbad gehalten (b). Nach Abkühlung auf Zimmertemperatur wird mit 1 ml dieses Ausgangsmateriales eine dekadische Verdünnungsreihe angelegt (c). Aus den ersten drei Verdünnungsstufen werden je drei MPN-Röhrchen mit TSB beimpft (d). Für die Erfassung höherer Sporenzahlen wird eine Plattenzählmethode angewendet (e). Die MPN-Röhrchen werden 24 h bei 30 °C bebrütet (f). Danach wird aus jedem Röhrchen ein fraktionierter Ösenausstrich auf EPM und EPMS durchgeführt (g). EPM dient hierbei zur Erfassung der mesophilen Bacillus-Sporen und der Sporen von B. cereus, auf EPMS wird das Wachstum NaCl-toleranter Bacillus-Species kontrolliert. Nach 48 h Bebrütung bei 30 °C (h) wird über die Zahl der bewachsenen Platten die Zahl der mit der Zielkeimgruppe bewachsenen Röhrchen bestimmt, wobei auf EPM Alkalisierung und Trübung des Mediums ein Kennzeichen für B. cereus ist. Mittels der MPN-Tabelle erfolgt die Bestimmung der Zahl der jeweiligen Sporen pro Gramm Lebensmittel (i).

4.7.3 Anmerkungen zu den Methodenentwürfen

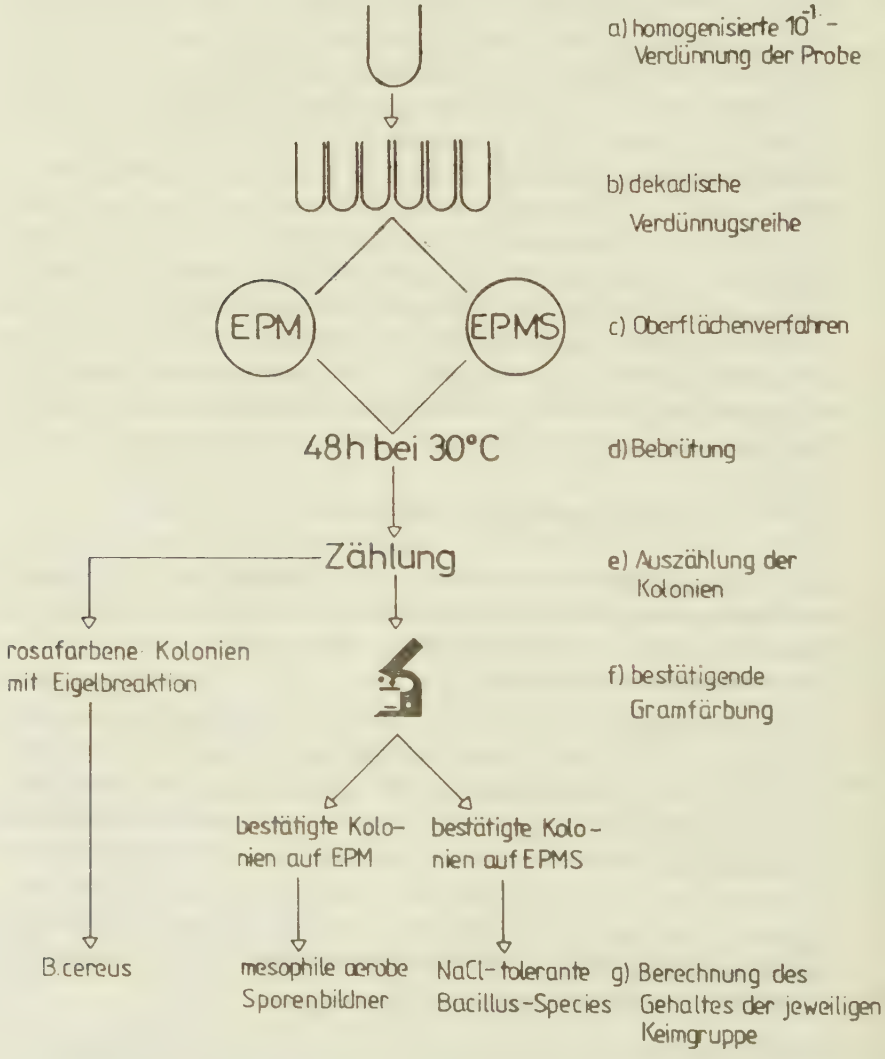
Bei den beschriebenen Methoden wird B. cereus durch die kombinierte Ablesung zweier Differenzierungsmerkmale identifiziert. Hierbei handelt es sich um die Lecithinasebildung und die fehlende Mannitolverwertung.

Aus der Literatur ist bekannt, daß in einigen Fällen auch Stämme anderer Bacillus-Species Lecithinase bilden können. Fast alle verwerten im Gegensatz zu B. cereus jedoch Mannitol und sind so durch Gelbfärbung der Kolonien von diesem abzugrenzen. Eine Ausnahme bilden nur B. alvei und einzelne Stämme von B. brevis, die wie B. cereus kein Mannitol verwerten. Beide Species sind jedoch in Lebensmitteln nur von untergeordneter Bedeutung und weisen zudem nicht die für B. cereus charakteristische Koloniemorphologie auf.

Vereinzelt werden in der Literatur auch Lecithinase-negative Stämme von B. cereus beschrieben. HOLBROOK und ANDERSON verwendeten 1980 für ihre Untersuchungen auch einen Lecithinase-negativen B. cereus-Stamm, der im Zusammenhang mit einer Lebensmit-

Abbildung 4 :

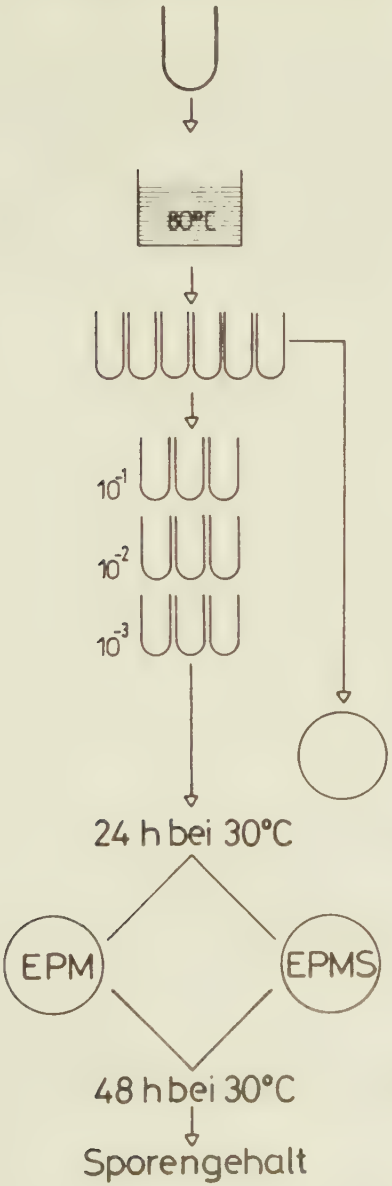
Selektive Erfassung von Bazillen in Lebensmitteln



EPM = Eigelb-Pyruvat-Mannitol-Medium
EPMS = EPM mit 7% NaCl

Abbildung 5 :

Erfassung von Bacillussporen in Lebensmitteln



a) homogenisierte 10^{-1}-Verdünnung der Probe

b) 10 Minuten bei 80°C

c) dekadische Verdünnungsreihe

d) multipler Röhrchentest

e) Plattenzähl-methode

f) Bebrütung

g) fraktionierter Ösenausstrich

h) Bebrütung

i) Bestimmung des Sporengehaltes mit der MPN-Tabelle

EPM = Eigelb-Pyruvat-Mannitol-Medium
EPMS = EPM mit 7% NaCl

telvergiftung isoliert wurde. Eine sichere Erfassung Lecithinase-negativer B. cereus-Stämme ist nach dem beschriebenen Verfahren nicht möglich.

Bei besonderem Verdacht aufgrund des Vorberichtes und bei morphologisch verdächtigen Kolonien (groß, rosafarben) sollten daher weitere Bestätigungsreaktionen angeschlossen werden. Im Methodenentwurf der International Organization for Standardization für die Erfassung von B. cereus werden als weitere kennzeichnende Reaktionen für diese Species Nitrat- und Glukoseabbau sowie Acetylmethylcarbinolproduktion genannt.

5. Schlußfolgerungen

Die bisher verfügbaren Selektivmedien für die quantitative Erfassung von Bazillen als Gruppe bzw. für einzelne in der Lebensmittelmikrobiologie interessante Teilgruppen, wie die potentiell toxinogenen Species, sind aufgrund ihrer bisher einseitig auf B. cereus ausgerichteten Konzeption nur begrenzt einsetzbar. Ihr Einsatz ist nur dann angezeigt, wenn in Lebensmittelproben im Vergleich zur Begleitflora hohe B. cereus-Anteile erwartet werden.

Nach Vergleich und Modifizierungsversuchen der verfügbaren Medien EP, KG, MYP und PEMBA haben sich als neue Versionen EPM und EPMS ergeben, und zwar EPM für die Gesamtzahl der Bazillen und EPMS für den Anteil der NaCl-toleranten Bacillus-Species.

Aber auch auf diesen Medien kann ein Wachstum grampositiver Kokken und einiger anderer Milchsäurebakterien nicht vollständig unterdrückt werden. Neben einer differenzierenden Ablesetechnik - Außerachtlassung extrem kleiner Kolonien - kann auf die mikroskopische Bestätigung stichprobenartig isolierter Einzelkolonien nicht verzichtet werden. Bei dieser Methode ergeben sich dann Schwierigkeiten, wenn die nicht selektierte Begleitflora um mehr als eine Zehnerpotenz über dem Gehalt an Bazillen liegt.

Andere kulturelle oder kulturell-biochemische Abgrenzungsmerkmale der Bazillen gegenüber den mitwachsenden grampositiven Kokken erwiesen sich bisher infolge der biochemischen Inhomogenität der Gattung Bacillus als nicht brauchbar.

Für die primäre Kultivierung von Bacillus-Sporen aus Lebensmitteln ist die Verwendung selektiver Medien unnötig, wenn eine 10-minütige Heißhaltung der Probe im 80 ^{o}C heißen Wasserbad angewendet wird. Durch dieses Verfahren werden vorhandene Begleitkeime abgetötet.

Zur Ermittlung geringer Sporenzahlen ist die MPN-Methode in Verbindung mit TSB als primäres Kulturmedium zu empfehlen. Zur Be-

stätigung werden EPM und EPMS als Kontrollmedien eingesetzt, wodurch eine parallele Erfassung von drei Zielkeimgruppen, nämlich B. cereus, mesophile aerobe Bazillen und NaCl-tolerante Bacillus-Species, ermöglicht wird.

Bei der Erfassung höherer Sporenzahlen mit einer Plattenzählmethode bringt die Verwendung eigelbhaltiger Nährmedien nicht die höchste Ausbeute. So ist die Verwendung dieser Medien nur dann zu empfehlen, wenn gezielt auf B. cereus untersucht werden soll. Zur Ermittlung der Gesamtzahl von Bacillus-Sporen sollte ein weniger komplexes Medium verwendet werden.

Bei Lebensmitteln ist der Bacillus-Gehalt deutlich produktgebunden, und zwar sowohl hinsichtlich der Quantität als auch im Hinblick auf die vorkommenden Species. Während Gewürze verhältnismäßig hohe Keimgehalte aufweisen, die überwiegend oder ausschließlich von Bazillen bestimmt werden, ist bei frischem Fleisch und rohen Fleischerzeugnissen der Anteil aerober Sporenbildner an der Gesamtflora niedriger. Der Anteil an NaCl-toleranten Bacillus-Species ist bei Gewürzen und bei hitzebehandelten Fleischerzeugnissen (Wurstwaren) erheblich höher als bei anderen Produkten.

Eine ähnliche Produktgebundenheit zeigt sich auch bei der Untersuchung auf Bacillus-Sporen. So liegt der Sporengehalt bei Gewürzen und Trockennahrungsmitteln meist nur unwesentlich unter der aeroben Gesamtkeimzahl, während bei den übrigen Lebensmitteln geringere Sporenzahlen zu verzeichnen sind.

Die Entscheidung für die MPN-Schätzung oder die Plattenzählmethode zur Erfassung des Sporengehaltes muß von der Art des zu untersuchenden Lebensmittels abhängig gemacht werden.

6. Zusammenfassung

Einzelne Species der Gattung Bacillus haben in den letzten Jahren als Lebensmittelvergifter eine gesteigerte Aufmerksamkeit erlangt. Begünstigt wurde dies durch eine neue mikroökologische Situation bei zunehmender Gemeinschaftsverpflegung.

Bisher waren Selektivmedien zur Kultivierung der aeroben Sporenbildner vornehmlich auf die Species B. cereus zugeschnitten, da man allgemein der Auffassung war, daß nur diese Species zur Bildung toxischer Faktoren und zur Auslösung von Lebensmittelvergiftungen fähig ist. Mittlerweile wurde aber nachgewiesen, daß auch andere Bacillus-Species, u.a. B. licheniformis, B. pumilus und B. subtilis, als potentielle Toxinbildner und Lebensmittelvergifter anzusehen sind. Deshalb sollte die Methodenstrategie überdacht werden. Gesucht wurde nach einer Methode für die selektive Erfassung der Gruppe der potentiell toxinogenen aeroben Sporenbildner sowie nach einem Selektivmedium für die Erfassung der Gesamtzahl an Bazillen in Lebensmitteln, außerdem nach brauchbaren Verfahren zur Ermittlung niedriger und höherer Sporenzahlen.

Zunächst wurden bereits verfügbare Selektivmedien für Bazillen bzw. B. cereus (MYP, EP, KG, PEMBA) vergleichend geprüft. Dazu wurden Stämme von Bazillen und weiteren Keimgruppen der Lebensmittelmikroflora herangezogen. Sie wurden auf diesen Medien hinsichtlich ihrer Wachstumsraten sowie kennzeichnender morphologischer und biochemischer Kriterien beurteilt. Es stellte sich heraus, daß nur das EP-Medium durch ausreichende Selektivität als Basis weiterer Untersuchungen geeignet erschien.

Aber auch dieses Medium vermochte einen Teil der grampositiven Kokken nur unzureichend zu hemmen. Deshalb sollte durch Modifikationen des Nährmediums und des Auswerteverfahrens eine Verbesserung erreicht werden.

Es gelang bisher nicht, mit einfachen biochemischen Kriterien die sichere Abgrenzung der mitwachsenden Mikrokokken und einiger Lactobacillus-Species bereits beim Ablesen der Platten

zweifelsfrei zu erzielen, so daß in besonderen Fällen Bestätigungen mit Hilfe mikroskopischer Identifizierung repräsentativer Kolonien vorgenommen werden müssen. Diese Situation trifft jedoch nur für bestimmte Lebensmittel zu.

Hingegen gelang es, durch Zusatz von NaCl (7% w/v) der gezielten Erfassung potentiell toxinogener Bacillus-Species einen bedeutenden Schritt näher zu kommen. Dieser Zusatz schränkte auch das Wachstum der Kokken weiter ein.

Der Zusatz von Mannitol und Phenolrot zum EP-Medium ermöglichte die gezielte Erfassung von B. cereus anhand der Eigelb- und der negativen Mannitolreaktion. Die Bezeichnung des neuen Mediums ist EPM ohne und EPMS mit 7% NaCl-Zusatz.

Für die Erfassung der Gesamtzahl von Bazillen aus Lebensmitteln eignet sich das EPM-Medium unter gleichzeitiger Anwendung der zuvor beschriebenen Bestätigungsreaktion.

Für die Erfassung von Bacillus-Sporen erwies sich nach einer Hitzeaktivierung durch 10-minütige Heißhaltung des Probengutes bei 80 ^{o}C die Verwendung selektiver Medien für die Erstkultivierung als unnötig. Die Begleitflora wird durch diese Hitzebehandlung ausnahmslos abgetötet.

Bei sehr niedrigen Sporengehalten erbrachte die MPN-Methode in Verbindung mit TSB als Kulturmedium optimale Ergebnisse. Für die Kontrolle der Röhrchen auf Wachstum der jeweiligen Zielkeimgruppe war die parallele Subkultivierung auf EPM und EPMS erforderlich.

Bei der Erfassung höherer Sporengehalte in Lebensmitteln im Oberflächenkulturverfahren konnten auf wenig komplexen Medien ohne Eigelb und Mannitol die besten Ergebnisse erzielt werden. Für die gezielte Erfassung höherer Gehalte an B. cereus-Sporen kann man jedoch auf die Ablesung dieser charakteristischen Merkmale nicht verzichten.

Bei den untersuchten Lebensmitteln ergaben sich deutliche produktgruppenabhängige Unterschiede im Verhältnis der Bazillen zu

aeroben Gesamtkeimzahl und in den Anteilen der einzelnen Zielkeimgruppen innerhalb dieser Gattung. Bei Trockennahrungsmitteln und Gewürzen spielten Bazillen eine dominierende Rolle. In diesen Produkten kam auch den NaCl-toleranten Bacillus-Species ein zahlenmäßig wichtiger Anteil zu.

Anhand der gewonnenen Erkenntnisse wurden Empfehlungen für den Untersuchungsgang von Lebensmitteln auf (1) die Gesamtzahl mesophiler aerober Sporenbildner, (2) die Gruppe der NaCl-toleranten Species und (3) B. cereus sowie (4) auf mesophile Sporen der jeweiligen Zielkeimgruppe als Methodenkonzept zusammengefaßt.

7. Summary

During the last years, certain species of the genus Bacillus have obtained increased interest as food-poisoners. This was favoured by a changed micro-ecology due to increased common nutritition.

So far, selective media for the cultivation of aerobic spore-formers were mainly directed to the species B. cereus, because of common oppinion that only this species is able to form toxic factors and to release food-poisoning. Meanwhile it has been proved that other Bacillus species, for instance B. licheniformis, B. pumilus and B. subtilis, should also be regarded as potential toxin-producers and as food-poisoners. Therefore the way of investigations had to be considered. Sought for is

1) a method for the selective cultivation of the group of potential toxigenic aerobic spore-formers
2) a selective medium to cover the total number of bacilli in foods
3) a reliable procedure to determine lower and higher numbers of Bacillus-spores.

To begin with, already available selective media for bacilli respectively for B. cereus (MYP, EP, KG, PEMBA), were compared by using strains of bacilli and other members of food-microflora. On these media they were judged by rate of multiplication and by characteristic morphological and biochemical criteria. Only the EP-medium turned out to be selective enough to form a base for further investigation, though a part of the gram-positive cocci was suppressed insufficiently. Therefore by modification of the culture medium and the method of evaluation an improvement was attempted.

So far it has been impossible with simple biochemical criteria to differentiate reliably the growing micrococci and some Lactobacillus-species while reading the plates. In specific cases it will become necessary to gain confirmation by microscopical identification of representative colonies. However, this situation is only the case for certain foodstuffs.

By adding NaCl (7% w/v) it was possible to take an important step towards specific detection of potentially toxigenic Bacillus species. This addition also stunted the cocci further. By adding phenol red to the EP-medium the missing mannitol-utilisation together with the egg yolk-reaction, it became possible to detect B. cereus selectively. Designation of the new medium is EPM without and EPMS with 7% NaCl.

To detect the total number of bacilli in foods the new medium is suitable if verification is made by microscopical identification.

To detect Bacillus-spores, the use of selective media for the primary cultivation proved unnecessary if the samplesewere heated to 80 ^{o}C for ten minutes; this heat-treatment kills the accompanying microorganisms.

In the case of a very low spore-concentration the MPN-method, together with TSB as a culture-medium, provided sufficient results. To control the growth of the respective microorganisms it was necessary to produce a parallel subcultivation on EPM and EPMS.

The best results in detecting higher spore-concentrations in foods (by using surface-plating) were achieved on low-complex-media without egg yolk and mannitol. For controlled detection of higher concentrations of B. cereus-spores one cannot dispense of regarding these characteristic marks.

Dependent on product groups, the analysed foodstuffs revealed evident differences in the relation of bacilli and total numbers of aerobic microorganisms as well as in the composition of the Bacillus-flora. With dried foods and spices bacilli are a dominant factor. In these products also the NaCl-tolerant Bacillus species formed a numerical important quote.

Based on these conclusions, recommendations were summarized to analyse foods for

1) the total number of mesophile aerobic spore-formers
2) the group of NaCl-tolerant Bacillus species
3) B. cereus and
4) mesophile spores of the respective germ-groups.

8. Literaturverzeichnis

Ahmed, A. A., K. M. Moustafa u. E. H. Marth (1983):

Incidence of Bacillus cereus in milk and some milk productes.

J. Food Protect. 46, 126 - 128

American Public Health Association (1976):

Standard methods for the examination of water and waste-water. 14. Aufl.

American Public Health Association, Washington DC S. 924 - 925

Angersbach, H. (1970):

Systematische mikrobiologische und technologische Untersuchungen zur Verbesserung der Beschaffenheit vom Tier stammender Lebensmittel.

Vet. Med. Diss., Gießen

Balalescu, C. (1974):

Ober einen Selbstversuch mit Bacillus cereus.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 151, 196 - 199

Balalescu, C. (1975):

Über einen von Bacillus cereus synthetisierten "lethal factor.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 161, 178 - 187

Barkley, M. B. u. P. Delaney (1980):

An occurence of bitty cream in Australian pasteurized milk.

Netherl. Milk Dairy J. 34, 191 - 198

Bastar, M. (1975):

Praktickā Taxonomie aerobnich Sporulātu. (Tschech.)

Sburnik Vedecky Praci 5, 71 - 81

Bayliss, C. E., W. M. Waites u. N. R. King (1981):

Resistance and structure of spores of Bacillus subtilis.

J. Appl. Bact. 50, 379 - 390

Becker, H., T. A. El-Bassiony u. G. Terplan (1984):

Zum Vorkommen von Bacillus cereus und anderen pathogenen Mikroorganismen in Säuglings- und Kleinkindernahrung.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 179, 198 - 216

Bell, R. G. u. K. M. De Lacy (1983):

A note on the microbial spoilage of undercooked chub-packed luncheon meat.

J. appl. Bact. 54, 131 - 134

Bell, R. G. u. K. M. De Lacy (1985):

The effect of nisin-sodium chloride interactions on the outgrowth of Bacillus licheniformis spores.

J. appl. Bact. 59, 127 - 132

Berkel, H. (1976):

Graduelle Bewertung Fett und Eiweiß spaltender Wirkungen von Stämmen der Gattung Bacillus unter Laborbedingungen.

Fleischwirtsch. 56, 395 - 398

Berkel, H. u. R. Hadlok (1976 a):

Differenzierung und Speziesverteilung von aus Brüh- und Kochwürsten stammenden Mikroorganismen der Gattung Bacillus.

Fleischwirtsch. 56, 387 - 392

Berkel, H. u. R. Hadlok (1976 b):

Lecithinase- und Toxinbildung durch Stämme der Gattung Bacillus.

Arch. Lebensmittelhyg. 27, 63 - 65

Blakey, L. u. F. G. Priest (1980):

The occurence of Bacillus cereus in some dried foods including pulses and cereals.

J. appl. Bact. 48, 297 - 302

Blocher, J. C. u. F. F. Busta (1982):

Constituents of media for recovery of sporeformers from foods.

Arch. Lebensmittelhyg. 33, 138 - 142

Bodnar, S. (1962):

Ober durch Bac. cereus verursachte alimentäre atypisch verlaufende Lebensmittelvergiftungen.

Z. ges Hyg. 8, 388 - 390

Bodnar, S. u. I. Nikodemusz (1981):

Durch aerobe Sporenbildner verursachte, schwer verlaufende Darmerkrankungen in Ungarn.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 251, 79 - 82

Bomar, M. T. (1979):

Mikrobiologische Aspekte gelagerter, hartgekochter Eier.

Zeitschr. Ernährungswiss. 18, 233 - 238

Bonventre, P. F. (1970):

Nomenclature of microbial toxins: problems and recommendations.

in: S. J. Ajl, S. Kadis u. T. C. Montie (Hrsg.): Microbial toxins. Bd. I
Academic Press Verlag, New York, London, S. 29 - 66

Briggs, A. (1966):

The resistance of spores of the genus Bacillus to phenol, heat and radiation.

J. appl. Bact. 29, 490 - 504

Briggs, A. u. S. Yazdany (1970):

Effect of sodium chloride on the heat and radiation resistance and on the recovery of heated or irradiated spores of the genus Bacillus.

J. appl. Bact. 33, 621 - 632

Bryan, F. L., C. A. Bartleson u. N. Christopherson (1981):

Hazard analyses, in reference to Bacillus cereus, of boiled and fried rice in Cantonese-style restaurants.

J. Food Protect. 44, 500 - 512

Buttiaux, R. u. H. Beerens (1968):

La microbiologie des aliments deshydrates; leur qualité hygenique.

in: E. H. Kampelmacher, M. Ingram u. D. A. A. Mossel (Hrsg.): 6. Int Sympos. Food Microbiol. Bilthoven, 1968, Proceed., S. 48 - 62

Candeli, A., A. De Bartolomeo, V. Mastrandrea u. F. Trotta (1979):

Contribution to the characterisation of Bacillus megaterium.

Int. J. Syst. Bact. 29, 25 - 31

Cerny, G., W. Hennlich u. K. Poralla (1984):

Fruchtsaftverderb durch Bazillen: Isolierung und Charakterisierung des Verderbniserregers.

Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 179, 224 - 227

Chapman, G. H. (1948):

An improved stone medium for the isolation and testing for food poisoning Staphylococci.

Food Res. 13, 100 - 105

Chopra, A. K. u. D. K. Mathur (1984):

Isolation, sreening and characterisation of thermophilic Bacillus-species isolated from dairy products.

J. appl. Bact. 57, 263 - 267

Christiansen, O., S. O. Koch u. P. Madelung (1951):

Et udbrud af levensmiddelforgiftning forarsaget af Bacillus cereus.

Nord. Vet. Med. 3, 194 - 202

Claus, D. (1982):

Vorkommen und Bedeutung von Bacillus-Arten.

286. KIN-Informationsseminar

Cook, A. M. u. R. J. Gilbert (1969):

The effect of sodium chloride on heat resistance and recovery of heated spores of Bacillus stearothermophilus.

J. appl. Bact. 32, 96 - 102

Cowan, S. T. u. K. J. Steel (1974):

Manual for the identification of medical bacteria. 2. Aufl.

Cambridge University Press, Cambridge, S. 46

Dack, G. M., H. Sugiyama, F. J. Owens u. J. B. Kirsner (1954):

Failure to produce illness in human volunteers fed Bacillus cereus and Clostridium perfringens.

J. inf. Dis. 94, 34 - 38

Danielson, M.-L., K.-E. Hammarberg u. G. Wittander (1980):

(Bacteriology and hygiene of goats' milk cheese.) (schwed.)

Var Foeda 32 (suppl. 3), 203 - 276

Daubner, J. u. J. Mayer (1968):

Die Anwendung des Oxydase-Tests bei der hygienischen Wasseranalyse.

Arch. Hyg. Bakt. 152, 302 - 305

Deltschew, C. u. D. Sawow (1969):

Untersuchungen über die aerobe sporenbildende Mikroflora der Fleischwaren.

5. Symp. WAVFH, Opatija, 1969, Proceed., S. 291 - 294

Dobbertin, S. u. H. Siems (1975):

Die bakteriologische Beschaffebheit von Speiseeis.

Arch. Lebensmittelhyg. 26, 110 - 115

Donovan, K. O. (1958):

A selective medium for Bacillus cereus in milk.

J. appl. Bact. 21, 100 - 103

Driessen, F. M. u. J. Stadhouders (1980):

(New defect in stirred yoghurt.)(niederl.)

Zuivelzicht 72, 754

El-Gendy, S. M., M. Kamal, E. Youssef, M. Hussein u. M. E. Hassan (1979):

Microflora of fresh and stored margarine.

Egypt. J. Food Sci. 5, 61 - 66

El-Mabsout, Y. E. u. K. E. Stevenson (1979):

Activation of Bacillus stearothermophilus spores at low pH.

J. Food. Sci. 44, 705 - 709

Eloy, C. u. R. Lacrosse (1976):

Composition d'un milieu de culture destine a effecteur le denombrement des micro-organismes thermophiles du yoghourt.

Bull. Rech. Agron. Gembloux 11, 83 - 86

Elter, B. (1966):

Beitrag zum problem der Lebensmittelvergiftungen durch aerobe Sporenbildner.

Z. ges. Hyg. 12, 65 - 69

Eschment, R. (1983):

Sonstige bakterielle Enteritis-Erreger (u. a. Sporenbildner, Nicht-Cholera-Vibrionen).

Bundesgesundhbl. 26, 395 - 399

Ettel, W. (1982):

Beitrag zur mikrobiologischen Beurteilung von belegten Brötchen (Sandwich, Canape).

Alimenta 21, 95 - 100

Ezepchuk, Y. V. u. F. S. Fluer (1973):

The enterotoxic effect.

Moderne Medizin 3, 20 - 25 zit. nach Turnbull (1981)

Ezepchuk, Y. V., V. M. Bodnarenko, E. A. Yakovleva u. I. P. Koryagina (1979):

The Bacillus cereus toxin: isolation of permeability factor.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 244, 275 - 284

Feig, S. u. A. K. Stersky (1981):

Characterisation of a heat-resistant strain of Bacillus coagulans isolated from cream-style canned corn.

J. Food Sci. 46, 135 - 137

Fenton, P. A., K. W. Dobson, A. Eyre u. M. W. McKendrick (1984):

Unusually severe food poisoning from vanilla slices.

J. Hyg. Camb. 00, 377 - 380

Franklin, J. G. (1969):

Some bacteriological problems in market milk industry in U.K..

J. Soc. Dairy Technol. 22, 100 - 112
zit. nach Ahmet et al. (1983)

Franksen, H., R. Hadlok u. H. Bartels (1969):

Beitrag zur Frage der Aufstellung von Normkeimzahlen für Brühwürste.

Fleischwirtsch. 10, 1339 - 1342

Fries, R. u. F.-Chr. Lenz (1983):

Stufenkontrollen in einem Geflügelschlachtbetrieb (Broiler). Mitt. 3. Qualitative Erhebungen.

Fleischwirtsch. 63, 1474 - 1477

Gibriel, A. Y., H. A. El-Mansy u. N. Gamal (1980):

Heat resistance of Bacillus spores isolated from some vegetables and fruits.

in: Abstracts of the XII International Congress of Microbiology. Food Sci. technol. Abstr. 12, 171

Gilbert, R. J. (1979):

Bacillus cereus gastroenteritis.

in: H. Riemann u. F. L. Bryan (Hrsg.): Food-borne infections and intoxications. 2. Aufl. Academic Press Verlag, New York, San Francisco, S. 495 - 518

Gilbert, R. J. u. J. M. Kramer (1984):

Bacillus cereus enterotoxins: present status.

Biochem. Soc. Transact. 12, 198 - 200

Gilbert, R. J. u. J. M. Parry (1977):

Serotypes of Bacillus cereus from outbreaks of food poisoning and from routine foods.

J. Hyg. Camb. 78, 69 -74

Gilbert, R. J. u. A. J. Taylor (1975):

Das Auftreten von Bacillus cereus-Lebensmittelvergiftungen in Großbritannien.

Arch. Lebensmittelhyg. 26, 38

Gilbert, R. J., M. F. Stringer u. T. C. Peace (1974):

The survival and growth of Bacillus cereus in boiled and fried rice in relation to outbreaks of food poisoning.

J. Hyg. Camb. 73, 433 - 444

Gilbert, R. J., P. C. B. Turnbull, J. M. Parry u. J. M. Kramer (1981):

Bacillus cereus and other Bacillus species: Their part in food poisoning and other clinical infections.

in: R. C. W. Berkeley u. M. Goodfellow: The aerobic endospore-forming bacteria: classification and identification.
Academic Press Verlag, London, New York, S. 297 - 314

Gill, C. O., N. Penney u. P. M. Nottingham (1978):

Tissue sterility in unviscerated carcasses.

Appl. Env. Microbiol. 36, 356 - 359

Glatz, B. u. J. M. Goepfert (1973):

Extracellular factor synthesized by Bacillus cereus which evokes a dermal reaction in guinea pigs.

Infect. Immun. 8, 25 - 29

Glatz, B., W. M. Spira u. J. M. Goepfert (1974):

Alteration of vascular permeability in rabbits by culture filtrates of B. cereus and related species.

Infect. Immun. 10, 299 - 303

Goepfert, J. M., Spira, W. M. u. H. U. Kim (1972):

Bacillus cereus: food poisoning organism - a review.

J. Milk Food Technol. 35, 213 - 227

Gordon, R. E. (1977):

The genus Bacillus.

in: A. J. Laskin u. H. A. Lechevalier (Hrsg.): Handbook of microbiology. 2. Aufl.
CRC-Press Verlag, Boca Raton, USA, S. 319 - 336

Gordon. R. E., W. G. Haynes u. C. H. Pang (1973):

The genus Bacillus.

Agricultural Handbook No. 427, US Department of Agriculture, Washington D. C.

Gorina, L. G., F. S. Fluer, A. M. Olonikow u. Y. V. Ezepchuk (1975):

Use of the aggregate-hemagglutination technique for determining exo-enterotoxin of Bacillus cereus.

Appl. Microbiol. 29, 201 - 204

Hadlok, R. M. (1983):

Die Bedeutung der Gattung Bacillus in der Lebensmittelhygiene.

in: Schriftenreihe Schweiz. Ges. Lebensmittelhyg. 13, 68 - 106

Haenel, H., W. Goldbach, G. Hoffmann, F. Köhler, W. Müller-Bentow u. I. Nikodemusz (1965):

Zum Nachweis von Hefen, Staphylokokken, aeroben Sporenbildnern und Pseudomonas sowie von Lysozym im Stuhl gesunder Erwachsener.

Zbl. Bakt. I. Orig. 197, 244 - 255

Harmon, S. M. (1982):

New method for differentiating members of the Bacillus cereus group: collaborative study.

J. Assoc. off. anal. Chem. 65, 1134 - 1139

Harmon, S. M., D. A. Kautter u. F. D. McClure (1984):

Comparison of selective plating media for enumeration of Bacillus cereus in foods.

J. Food Protect. 47, 65 - 67

Hartgen, H. u. D. J. Kahlau (1985):

Bedeutung der Koloniezahl bei Haushaltsgewürzen.

Fleischwirtsch. 65, 99 - 102

Hartung, M. (1985):

Die Kreuzimmunelektrophorese (KIE) als Mittel zur Speciesdifferenzierung und ihr einsatz für taxonomische Betrachtungen an Vertretern des Genus Bacillus.

Vet. med. Diss., FU Berlin

Hauge, S. (1950):

Matforgiftninger fremkalt av Bacillus cereus.

Nord. Hyg. Tidskr. 31, 189 - 205
zit. nach Dack et al. (1954)

Hauge, S. (1955):

Food poisoning caused by aerobic spore-forming bacilli.

J. appl. Bact. 18, 591 - 595

Hauke, H. (1961):

Die Bedeutung der aeroben Sporenbildner für die Lebensmittelhygiene.

Wiss. Ztschr. Karl-Marx-Univers. Leipzg. 10, 303 - 305

Havelaar, A. H., C. J. Hoogendorp, A. J. Wesdorp u. W. A. Scheffers (1980):

False negative oxidase reaction as a result of medium acidifikation.

Antonie van Leeuwenhoek 46, 301 - 312

Hefnawy, Y., H. Youssef, H. Abdel-Rahman u. A. Lotfi (1984):

Vorkommen von Bacillus cereus in ausgewählten Fleischprodukten.

Fleischwirtsch. 64, 1394 - 1395

Hellmann, E. (1972):

Enthalten aerobe Sporenbildner durch Trypsinverdauung aktivierbare Endotoxine?

Zbl. Bakt. Hyg., I.Abt. Orig. A 221, 206 - 220

Henner, S., H. Hartgen, W. Klein u. M. Schneiderhan (1983):

Mikrobiologischer Status von Gewürzen für Fleischerzeugnisse.

Fleischwirtsch. 63, 1051 - 1053

Hess, E. u. G. Lott (1970):

Kontamination des Fleisches während und nach der Schlachtung.

Fleischwirtsch. 50, 47 - 50

Hildebrandt, G. u. G. Arndt (1982):

Die MPN-Schätzung in Theorie und Praxis.

Fleischwirtsch. 62, 357 - 363 u. 517 - 519

Holbrook, R. u. J. M. Anderson (1980):

An improved selective and diagnostic medium for the isolation and enumeration of Bacillus cereus in foods.

Can. J. Microbiol. 26, 753 - 759

Inal, T. (1971):

Vergleichende Untersuchungen über die Selektivmedien zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Bacillus cereus in Lebensmitteln. Mitt. 1.

Fleischwirtsch. 11, 1629 - 1632

Inal, T. (1972):

Vergleichende Untersuchungen über die Selektivmedien zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Bacillus cereus in Lebensmitteln. Mitt. 2, 3, 4.

Fleischwirtsch. 3, 347 - 353, 8, 1021 - 1023 u. 9, 1160 - 1162

Jinbo, K., M. Matsumoto u. H. Murakami (1978):

(Development of a selective enumeration medium for B. cereus in food of animal origin.) (jap.)

Ann. Rep. Tokyo Metropol. Res. Lab. Publ. Health, 29, 158 - 162

Johnson, C. E. u. P. F. Bonventre (1967):

Lethal toxin of Bacillus cereus. I. Relationships and nature of toxin, hemolysin, and phospholipase.

J. Bact. 94, 306 - 316

Johnson, K. M. (1984):

Bacillus cereus foodborne illness - an update.

J. Food Protect. 47, 145 - 153

Johnson, K. M. u. F. F. Busta (1984):

Heat induced temperature sensitivity of outgrowing Bacillus cereus spores.

Appl. Env. Microbiol. 47, 768 - 774

Johnson, K. M., C. L. Nelson u. F. F. Busta (1982):

Germination and heat resistance of Bacillus cereus spores from strains associated with diarrheal and emetic food-borne illness.

J. Food Sci. 47, 1268 - 1271

Johnson, K. M., C. L. Nelson u. F. F. Busta (1983):

Influence of temperature on germination and growth of spores of emetic and diarrheal strains of Bacillus cereus in a broth medium and in rice.

J. Food Sci. 48, 286 - 287

Johnson, K. M., C. L. Nelson u. F. F. Busta (1984):

Influence of heating and cooling rates on Bacillus cereus spore survival and growth in a broth medium and in rice.

J. Food Sci. 49, 34 - 39

Johnston, D. W. u. J. Bruce (1982):

Incidence of thermoduric psychrotrophs in milk produced in the west of Scotland.

J. appl. Bact. 52, 333 - 337

Kabuczu, A., H. Angersbach u. R. Hadlok (1972):

Beitrag zur Aufstellung von Normkeimzahlen für Leberwürste.

Fleischwirtsch. 52, 497 - 500

Katsaras, K. u. G. Hildebrandt (1979):

Ursachen bakterieller Lebensmittelvergiftungen: Bacillus cereus Toxine.

Fleischwirtsch. 59, 668 - 676

Katsaras, K. u. U. P. Zeller (1977):

Nachweis von Bacillus cereus-Toxinen.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 238, 255 - 262

Kelch, F. (1961):

Ober die Differenzierung von Bazillen, die aus Dosenschinken isoliert wurden.

Fleischwirtsch. 13, 294 - 299

Keynan, A. u. Z. Evenchik (1969):

Activation.

in: G. W. Gould u. A. Hurst (Hrsg.): The bacterial spore.
Academic Press Verlag, London, S. 359 - 396

Kim, H. U. u. J. M. Goepfert (1971):

Enumeration and identification of Bacillus cereus in foods.

Appl. Microbiol. 22, 581 - 587

Kokubo, Y., K. Jinbo u. H. Murakami (1982):

(Prevalence of spore-forming bacteria in sugar, starch, spices and vegetable protein.) (jap.)

Ann. Rep. Tokyo Metropol. Res. Lab. Publ. Health 33, 155 - 160, in: Food Sci. technol. Abstr. 17, 257 (1985)

Konuma, H., S. Takayama, T. Kawanishi u. A. Suzuki (1980):

(Microbial flora of beef extract imported from Australia, Uruguay, Italy and Brazil.) (jap.)

Bull. Nation. Inst. Hyg. Sci. 98, 36 - 40

Kramer, J. M. (1984):

Bacillus cereus exotoxins: production, isolation, detection and properties.

in: J. E. Alouf, F. J. Fehrenbach, F. J. Freer u. J. Jeljaszewicz (Hrsg.): Bacterial protein toxins. Academic Press Verlag, London, S. 385 - 386

Kramer, J. M., P. C. B. Turnbull, G. Munshi u. R. J. Gilbert (1982):

Identification and characterisation of Bacillus cereus and other Bacillus species associated with foods and food poisoning.

in: J. E. L. Corry, D. Roberts u. F. A. Skinner (Hrsg.): Isolation and identification methods for food poisoning organims. Technical series, Bd. 17
Academic Press Verlag, London, S. 261 - 285

Kramer, J. M., P. C. B. Turnbull, K. Jørgensen, J. Parry u. R. J. Gilbert (1978):

Separation of exponential growth exotoxins of Bacillus cereus and their preliminary characterisation.

in: 47. Meeting Soc. Appl. Bact., Birmingham, 1978 (J. appl. Bact. 45 xix)

Krieg, A. (1970):

Über die Differenzierung der Mäuse-Toxizität des Bacillus cereus und des Bacillus thuringiensis von der Mäuse-Pathogenität des Bacillus anthracis.

Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 215, 523 - 529

Kundrat, W. (1970):

Die Bedeutung des Genus Bacillus Cohn für die Nahrungsmittelindustrie.

Alimenta 9, 157 - 163

Kuwabara, Y. u. S. Ueda (1980):

(Air borne bacilli in a food factory.) (jap.)

Jap. J. Hyg. 35, 378

Lancette, G. A. u. S. M. Harmon (1980):

Enumeration and confirmation of Bacillus cereus in foods: collaborative study.

J. Assoc. off. anal. Chem. 63, 581 - 586

Larkin, J. M. u. J. L. Stokes (1966):

Isolation of psychrophilic species of Bacillus.

J. Bact. 91, 1667 - 1671

Lubenau, C. (1906):

Bacillus peptonificans als Erreger einer Gastroenteritis-Epidemie.

Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 40, 433 - 437
zit. nach L. Nieper (1964): Zum Keimgehalt des Schabefleisches und Hackfleisches unter besonderer Berücksichtigung der aeroben Sporenbildner, insbesondere von Bacillus cereus. - Vet. med. Diss., Hannover

Ludwig, K. (1971):

Bacillus cereus als Ursache einer Lebensmittelintoxikation.

Arch. Lebensmittelhyg. 22, 104 - 107

Mackenzie, K. A. u. V. B. D. Skerman (1982):

Microbial spoilage in unpasteurized liquid whole egg.

Food. Technol. Austral. 34, 524 - 528

Man, J. C. de, M. Rogosa u. M. E. Sharpe (1960):

A medium for the cultivation of Lactobacilli.

J. appl. Bact. 23, 130 - 135

Marshall, B. J. u. D. F. Ohye (1966):

Bacillus macquariensis n. sp., a psychrotrophic bacterium from sub-antarctic soil.

J. gen. Microbiol. 44, 41 - 46

Masson, A. u. B. Vanos (1982):

Recherche d'un milieu sélectif pour l'isolement de Bacillus cereus et recherche qualitative de la contamination par Bacillus sp. dans divers épices arômates et condiments.

Industr. Aliment. Agric. 15, 237 - 251

Mc Gaughey, C. A. u. H. P. Chu (1948):

The egg-yolk reaction of aerobic sporing bacilli.

J. gen. Microbiol. 2, 334 - 340

Mead, G. C. u. B. W. Adams (1977):

A selective medium for the rapid isolation of Pseudomonas associated with poultry meat spoilage.

Br. Poult. Sci. 18, 661 - 667

Melling, J., B. J. Capel, P. C. B. Turnbull u, R. J. Gilbert (1976):

Identification of a novel enterotoxigenic activity associated with Bacillus cereus.

J. clin. Pathol. 29, 938 - 940

Melling, J., B. J. Capel, M. D. Witham u. R. J. Gilbert (1978):

Identification and characterisation of Bacillus cereus emetic toxin.

in: 47. Meeting Soc. Appl. Bact., Birmingham, 1978 (J. appl. Bact. 45, xxv)

Meursing, E. H. u. H. Slot (1968):

The microbial condition of cocoa powder.

in: E. H. Kampelmacher, M. Ingram u. D. A. A. Mossel (Hrsg.): 6. Int. Sympos. Food Microbiol., Bilthoven, 1968, S. 433 - 443

Midura, T., M. Gerber, R. Wood u. A. R. Leonard (1970):

Outbreak of food poisoning caused by Bacillus cereus.

Publ. Health Rep. 85, 45 - 48

Mitamura, H., K. Kameyama u. Y. Ando (1979):

(The contamination of honey by spore-forming bacteria.) (jap.)

Rep. Hokkaido Inst. Publ. Health 29, 16 - 19

Mol, J. H. H. u. C. A. Timmers (1970):

Assessment of the stability of pasteurized comminuted meat products.

J. appl. Bact. 33, 233 - 247

Molnar, D. M. (1962):

Separation of the toxin of Bacillus cereus into two components and nonidentity of the toxin with phospholipase.

J. Bact. 84, 147 - 153

Montville, T. J. u. G. M. Sapers (1981):

Thermal resistance of spores from pH elevating strains of Bacillus licheniformis.

J. Food Sci. 46, 1710 - 1712, 1715

Mossel, D. A. A. (1984):

Introduction and prospective.

in: Int. Sympos. Int. Comm. Food. Microbiol. Hyg., London, 1984, Proceed. (Int. J. Food Microbiol. 2, 1 - 7, 1985)

Mossel, D. A. A., M. J. Koopman u. E. Jongerius (1967):

Enumeration of Bacillus cereus in foods.

Appl. Microbiol. 15, 650 - 653

Mossel, D. A. A., J. L. Shennan, E. H. Meursing, H. Slot u. H. J. Pouw (1973):

The enumeration of "all" spore-bearing cells of Bacillaceae in heat-processed foods.

Antonie van Leeuwenhoek 39, 656 (1973)

Mostert, J. F., H. Lueck u. R. A. Husmann (1979):

Isolation, identification and practical properties of Bacillus species from UHT and sterilized milk.

South Afric. J. Dairy Technol. 11, 125 - 132

Mukundan, M., M. Subrahmanyam u. M. N. Parameswaran (1979):

Studies on microflora in boiled milk.

Kerala J. vet. Sci. 10, 234 - 239

Murmann, D., F.-C. Lenz u. A. v. Maydell (1985):

"Gyros"-Ein Erzeugnis aus rohem und zerkleinertem Schweinefleisch.

Fleischwirtsch. 65, 685 - 690

Murrell, W. G. u. B. C. Rankine (1979):

Isolation and identification of a sporing Bacillus from bottled brandy.

Am. J. Enol. Viticult. 30, 247 - 249

Nikodemusz, I. (1958):

Bacillus cereus als Ursache von Lebensmittelvergiftungen.

Z. Hyg. 145, 335 - 338

Nikodemusz, I. (1962):

Ober einen neuen Elektivnährboden, der zur Isolierung von Bacillus cereus aus Mischflora geeignet ist.

Arch. Lebensmittelhyg. 13, 58 - 63

Nikodemusz, I. (1965):

Die Reproduzierbarkeit der von Bacillus cereus verursachten Lebensmittelvergiftungen bei Katzen.

Zbl. Bakt. I. Orig. 196, 81 - 87

Nikodemusz, I. (1967):

Die enteropathogene Wirkung von Bacillus cereus bei Hunden.

Zbl. Bakt. I. Orig. 202, 533 - 538

Nikodemusz, I. (1968):

Die Ätiologie der Lebensmittelvergiftungen in Ungarn in den Jahren 1960 bis 1966.

Zbl. Bakt. I. Ref. 214, 74 - 78

Nikodemusz, I. (1979):

Occurence of Bacillus cereus in foods.

Acta Aliment. 8, 111 - 116

Nikodemusz, I. u. G. Gonda (1963):

Die enteropathogene Wirkung aerober Sporenbildner bei Nagetieren.

Zbl. Bakt. I. Orig. 190, 237 - 242

Nikodemusz, I, T. Novotny, D. Bouquet u. R. Tarján (1967):

Ober die Ätiologie der Lebensmittelvergiftungen in Ungarn.

Zbl. Bakt. I. Orig. 203, 137 - 142

Nikodemusz, I., Z. Mrdody, A. Szentmihalyi u. M. Dombay (1969):

Experimente über die enteropathogene Wirkung von Bacillus.

Zentralbl. Bakteriol., I. Orig. 211, 274 - 279

Nikodemusz, I., S. Bodnar, M. Bojan, M. Kiss, P. Kiss, M. Laczko, E. Molnar u. D. Papay (1962):

Aerobe Sporenbildner als Lebensmittelvergifter.

Zbl. Bakt. I. Orig. 184, 462 - 470

Norris, J. R., Berkeley, R. C. W., Logan, N. A. u. A. G. O'Donnell (1981):

The genera Bacillus and Lactobacillus.

in: M. P. Schlegel, H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows u. H. G. Schlegel (Hrsg.): The Prokaryotes. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, S. 1711 - 1742

Nygren, B. (1962):

Phospholipase C - producing bacteria and food poisoning.

Acta Path. Microbiol. Scand. Suppl. 160

Obi, S. K. C. (1980):

Lecithinase- and toxin production in Bacillus species.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 246, 415 - 422

Obiger, G. (1976):

Untersuchungen über die Thermostabilität bedeutsamer Infektionserreger unter Bedingungen der Milchpasteurisation.

Arch. Lebensmittelhyg. 27, 137 - 144

O'Donnell, A. G., J. R. Norris, R. C. W. Berkeley, D. Claus, T. Kaneko, N. A. Logan u. R. Nozaki (1980):

Characterization of Bacillus subtilis, Bacillus pumilus, B. licheniformis, and Bacillus amyloliquefaciens by pyrolysis gas - liquid chromatography, deoxyribonucleic acid - deoxyribonucleic acid hybridization, biochemical tests, and API systems.

Int J. Syst. Bact. 30, 448 - 459

Ormay, L. u. T. Novotny (1970):

Ober sogenannte unspezifische Lebensmittelvergiftungen in Ungarn.

Zentralbl. Bakt. I. Orig. 215, 84 - 89

Palumbo, S. A., Rivenburgh, A. J., Smith, J. L. u. J. C. Kissinger (1975):

Identification of Bacillus subtilis from sausage products and spices.

J. appl. Bact. 38, 99 - 105

Peterz, M., C. Wiberg u. P. Norberg (1985):

Comparison of media for isolation of Bacillus cereus from foods.

J. Food Protect. 48, 969 - 970

Petts, D. N. (1984):

Colistin-oxolinic acid-blood agar: a new selective medium for Streptococci.

J. Clin. Microbiol. 19, 4 - 7

Pickett, D. A. u. D. F. Welch (1985)

Recognition of Staphylococcus saprophyticus in urine cultures by sreening colonies for production of phosphatase.

J. clin. Microbiol. 21, 310 - 313

Raevuori, M., T. Kiutamo, A. Niskanen u. K. Salminen (1976):

An outbreak of Bacillus cereus food-poisoning in Finland associated with boiled rice.

J. Hyg. Camb. 76, 319 - 327

Reusse, U. (1962):

Beitrag zur Bedeutung von prädisponierenden Einflüssen bei unspezifischen Lebensmittelvergiftungen.

Arch. Lebensmittelhyg. 13, 254 - 255

Reuter, G. (1968):

Erfahrungen mit Nährböden für die selektive mikrobiologische Analyse von Fleischerzeugnissen.

Arch Lebensmittelhyg. 19, 53 - 57 u. 84 - 89

Reuter, G. (1970):

Mikrobiologische Analyse von Lebensmitteln mit selektiven Medien.

Arch. Lebensmittelhyg. 2, 30 - 35

Reyes, A. L., R. G. Crawford, A. J. Wehby, J. T. Peeler, J. C. Wimsatt, J. E. Campbell u. R. H. Twedt (1981):

Heat resistance of Bacillus Spores at various relative humidities.

Appl. env. Microbiol. 42, 692 - 697

Rheinbaben, K. E. v. u. R. M. Hadlok (1984):

Produktgebundene Mikroflora verschiedener Fleischerzeugnisse.

Fleischwirtsch. 64, 1483 - 1486

Schallehn, G. u. H. Brandis (1973):

Phosphatase-Reagenz zur schnellen Identifizierung von Clostridium perfringens.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 225, 343 - 345

Scheibner, G. (1967):

Untersuchungen an Brühwurst-Halbkonserven. II. Einige lebensmittelhygienisch wichtige Eigenschaften der isolierten aeroben Sporenbildner.

Monatsh. Veterinärmed. 16, 666 - 670

Schmidt-Lorenz, W. (Hrsg.) (1980 - 1983):

Sammlung von Vorschriften zur mikrobiologischen Untersuchung von Lebensmitteln.

Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach

Schönberg, F. (1949):

Zur Entstehung und Verhütung sogenannter unspezifischer bakterieller Lebensmittelvergiftungen, insbesondere von Fäulnisintoxikationen.

Tierärztl. Umschau 4,149 - 151

Schönberg, F. u. R. Könekamp (1962):

Zur Temperaturabhängigkeit der von aeroben Bazillen, insbesondere von Bac. cereus und Bac. subtilis, verursachten Proteolyse in Fleisch, Fleischwaren und Milch. Zugleich ein Beitrag zur Entstehung der sogenannten unspezifischen Lebensmittelvergiftungen (Fäulnisintoxikationen).

Arch. Lebensmittelhyg. 13, 58 - 63

Schulze, K. u. T. Zimmermann (1983):

Mitwirkung der Veterinäruntersuchungsämter bei der Aufklärung von Lebensmittelvergiftungen. Fallbeschreibungen unter besonderer Berücksichtigung des Vorberichts und praktikabler Untersuchungsmethoden.

Fleischwirtsch. 63, 872 - 878

Seenappa, M. u. A. G. Kempton (1981):

A note on the occurence of Bacillus cereus and other species of Bacillus in indian spices of export quality

J. appl. Bact. 50, 225 - 228

Shapton, D. A., D. W. Lovelock u. R. Laurita-Longo (1971):

The evaluation of sterilization and pasteurization from temperature measurements in degrees Celsius (C^{o}).

J. appl. Bact. 34, 491 - 500

Sinell, H.-J. (1985):

Einführung in die Lebensmittelhygiene. 2. Aufl.

Parey Verlag, Berlin, Hamburg, S. 102 - 103

Sinell, H.-J. u. J. Baumgart (1965):

Selektivnährböden zur Isolierung von Staphylokokken aus Lebensmitteln.

Zbl. Bakt. I. Orig. 197, 447 - 461

Sinell, H.-J. u. J. Baumgart (1967):

Selektivnährböden mit Eigelb zur Isolierung von pathogenen Staphylokokken aus Lebensmitteln.

Zbl. Bakt. I. Orig. 204, 248 - 264

Singh, R. S., V. K. Batish, O. Parkash u. B. Ranganathan (1984):

Toxigenic Bacillus cereus var. fluorescens in human milk.

J. Dairy Sci. 67, 513 - 517

Singh, R. S., S. Singh, V. K. Batish u. B. Ranganathan (1980):

Bacteriological quality of infant milk foods.

J. Food Protect. 43, 340 - 342

Slein, M. W. u. G. F. Logan (1963):

Partial purification and properties of two phospholipases of Bacillus cereus.

J. Bacteriol. 85, 369 - 381

Slein, M. W. u. G. F. Logan (1965):

Characterization of the phospholipases of Bacillus cereus and their effects on erythrocytes, bone, and kidney cells.

J. Bact. 90, 69 - 81

Smith, T. (1979):

(Bacteriological quality of Danish cheeses.)(dän.)

Dansk Veterinärtidsskr. 62, 957 - 962

Smoot, L. A. u. M. D. Pierson (1982):

Inhibition and control of bacteria spore germination.

J. Food Protect. 45, 84 - 92

Spira, W. M. u. J. M. Goepfert (1972):

Bacillus cereus-induced fluid accumulation in rabbit ileal loops.

Appl. Microbiol. 24, 341 - 348

Spudich, J. A. u. A. Kornberg (1968):

Biochemical studies of bacterial sporulation and germination. VI. Origin of spore core and coat proteins.

J. biol. Chem. 243, 4588 - 4599

Srivastava, K. C., A. A. Paz, H. O. Saridakis, I. O. P. Popper u. S. R. P. De Castro (1981):

Microbiology of frozen goat meat and toxin production by Bacillus cereus isolated therefrom.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B. 174, 125 - 132

Stephen, J. u. R. A. Pietrowski (1981):

Bacterial toxins.

Verlag Van Nostrand Reinhold, Berkshire
(Aspects Microbiol. 2), S. 7 - 8

Stretton, R. J. u. R. A. Bulman (1975):

Experimental infection of rabbits with Bacillus cereus.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 232, 83 - 90

Szabo, R. A., E. G. Todd u. M. K. Rayman (1984):

Twety-four hour isolation and confirmation of Bacillus cereus in foods.

J. Food Protect. 47, 856 - 860

Tamminga, S. K., R. R. Beumer u. E. H. Kampelmacher (1980):

Bacteriological examination of ice-cream in the Netherlands: comparative studies on methods.

J. appl. Bact. 49, 239 - 253

Temper, K. (1963):

Exitus letalis nach Lebensmittelvergiftung durch Bacillus cereus.

Z. ges. Hyg. 9, 481 - 490

Thi-Son, N., u. G. H. Fleet (1980):

Behavior of pathogen bacteria in the oyster, Crassostrea commercialis, during depuration, re-laying, and storage.

Appl. env. Microbiol. 40, 994 - 1002

Thompson, J. S. (1985):

Colistin-oxolinic acid blood agar: a selsctive medium for the isolation of Gardnerella vaginalis.

J. clin. Microbiol. 21, 843

Thompson, N. E., M. J. Ketterhagen, M. S. Bergdoll u. E. J. Schantz (1984):

Isolation and some properties of an enterotoxin produced by Bacillus cereus.

Infect. Immun. 43, 887 - 894

Thompson, P. J. (1981):

Thermophilic organisms involved in food spoilage: flat-sour sporeforming aerobes.

J. Food Protect. 44, 154 - 156

Turnbull, P. C. B. (1981):

Bacillus cereus toxins.

Pharmacol. Ther. 13, 453 - 505

Turnbull, P. C. B. u. J. M. Kramer (1983):

Non-gastrointestinal Bacillus cereus infection: an analysis of exotoxin production by strains isolated over a two-year period.

J. clin. Pathol. 36, 1091 - 1096

Turnbull, P. C. B., J. M. Kramer, K. Jørgensen, R. J. Gilbert u. J. Melling (1979):

Properties and production characteristics of vomiting, diarrheal, and necrotizing toxins of Bacillus cereus.

Amer. J. clin. Nutr. 32, 219 - 228

Ueda, S., E. Amano, C. Kadota, M. Fujima, M. Makino, M. Yoshizawa u. Y. Kuwabara (1980a):

(Bacillus spp. from wheat flour and flour products.) (jap.)

J. Jap. Soc. Food Sci. Technol. 27, 453 - 455

Ueda, S., S. Asakusa u. Y. Kuwubara (1980b):

(Bacillus in commercial baby foods.) (jap.)

J. Jap. Soc. Food Sci. Technol. 27, 400 - 402

Ueda, S., A. Chiba u. Y. Kuwabara (1981):

(Bacillus spp. from the bread crumb coatimgs of commercial frozen foods for frying.) (jap.)

J. Jap. Soc. Food Sci. Technol. 28, 647 - 649

Vijayalakshmi, G., C. T. Dwarakanath u. V. Sreenivasa Murthy (1981):

Studies on Bacillus cereus contamination of rice and rice preparations.

J. Food Sci. Technol., India 18, 231 - 234

Wallen, S. E. u. H. W. Walker (1979):

Influence of media and media constituents on recovery of bacterial spores exposed to hydrogen peroxide.

J. Food Sci. 44, 560 - 563

Willemse-Collinet, M. F., Tromp, T. F. J. u. T. Huizinga (1980):

A simple and rapid computer-assisted technique for the identification of some selected Bacillus species using biochemical tests.

J. appl. Bact. 49, 385 - 393

Wyatt, C. J. u. V. H. Guy (1981):

Incidence and growth of Bacillus cereus in retail pumpkin pies.

J. Food Protect. 44, 422 - 424

Zitierte Normen und Normenvorschläge

DIN 10161 Mikrobiologische Untersuchung von Fleisch und Fleischerzeugnissen
Bestimmung der aeroben Keimzahl bei 30 °C
Tropfplattenverfahren
Februar 1984

DIN 10162 Mikrobiologische Untersuchung von Fleisch und Fleischerzeugnissen
Vorbereitung der Proben
Entwurf August 1981

DIN 10165 Mikrobiologische Untersuchung von Fleisch und Fleischerzeugnissen
Bestimmung von Clostridium perfringens
Plattengußverfahren (Referenzverfahren)
Februar 1984

ISO 234 E Meat and meat products - Enumeration of mesophilic aerobic bacterial spores
Entwurf Juli 1974

ISO/DIS 7932 Microbiology - General guidance for enumeration of Bacillus cereus - Colony count technique at 30 °C
Entwurf August 1985

Herrn Prof. Dr. G. Reuter möchte ich an dieser Stelle herzlich für die Oberlassung des Themas, seinen Einsatz für die Förderung des Vorhabens durch das Bundesgesundheitsamt und die intensive Betreuung der Untersuchungen danken. Beim Abfassen der Arbeit waren seine kritischen Ratschläge eine wichtige Unterstützung.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. G. Arndt. Sie leistete durch die graphische Aufarbeitung gewonnener Daten einen Beitrag zur Darstellung der Ergebnisse.

Bedanken möchte ich mich schließlich bei Frau B. Dlouhy, die mir durch ihre technische und moralische Unterstützung eine große Hilfe war, sowie bei allen Mitarbeitern der Fachrichtung Fleischhygiene, die an der Durchführung und Fertigstellung der Arbeit beteiligt waren.

- Diese Arbeit wurde gefördert durch das Bundesgesundheitsamt im Rahmen der Erarbeitung von Methoden für § 35 LMBG -

LEBENSLAUF

Name :	Angelika Bläschke
Geboren :	28. Februar 1957 in Berlin
Schulbildung :	1963 - 1969 Grundschule in Berlin-Steglitz 1969 - 1975 Gymnasium in Berlin-Steglitz Abitur : 23. Juni 1975
Studium :	1975 - 1981 Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin Tierärztliche Prüfung : 21. Dezember 1981 Mitfinanzierung des Studiums durch labordiagnostische Tätigkeit in einer Berliner Tierarztpraxis 1979 - 1982
Approbation :	26. Januar 1982
Praxistätigkeit :	1982 - 1983
Wiss. Tätigkeit :	Seit April 1982 Doktorandin am Institut für Lebensmittelhygiene, Fleischhygiene und -technologie, Fachrichtung Fleischhygiene. Seit Juli 1983 im selben Institut Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Rahmen von Drittmittelvorhaben.

Papyrus-Druck GmbH Berlin ☎ 3416451
Dissertationen